

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

KLASIFIKACE NÁDOROVÝCH BUNĚK POMOCÍ HLUBOKÉHO UČENÍ

TUMOR CELL CLASSIFICATION USING DEEP-LEARNING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jakub Majerčík

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tomáš Vičar

BRNO 2021

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Jakub Majerčík

ID: 211662

Ročník: 3

Akademický rok: 2020/21

NÁZEV TÉMATU:

Klasifikace nádorových buněk pomocí hlubokého učení

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostřednictvím odborné literatury se seznámte s metodami pro klasifikaci pomocí konvolučních neuronových sítí a hlubokého učení. 2) Provedte literární rešerši se zaměřením na vhodné metody pro interpretaci rozhodovacích procesů neuronových sítí. 3) Na základě předchozích bodů navrhnete a v libovolném programovém prostředí realizujete algoritmus pro klasifikaci obrazů buněk včetně metod pro vizualizaci a interpretaci této klasifikace. 4) Vytvořte (změřte) dostatečně velký dataset buněk pro klasifikaci. 5) Úspěšnost otestujte na těchto datech a statisticky vyhodnoťte. 6) Provedte diskusi dosažených výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] RAWAT, Waseem a Zenghui WANG. Deep Convolutional Neural Networks for Image Classification: A Comprehensive Review. Neural Computation. 2017, 29(9), 2352-2449. ISSN 0899-7667

[2] CHEN, Claire Lifan, Ata MAHJOUBFAR, Li-Chia TAI, Ian K. BLABY, Allen HUANG, Kayvan Reza NIAZI a Bahram JALALI. Deep Learning in Label-free Cell Classification. Scientific Reports. 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep21471. ISSN 2045-2322.

Termín zadání: 8.2.2021

Termín odevzdání: 28.5.2021

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vičar

Konzultant: MUDr. Jaromír Gumulec, Ph.D.

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Klasifikácia mikroskopických obrazov buniek rakoviny nachádza široké uplatnenie v súčasnej biológii a medicíne. Cieľom tejto práce je klasifikácia dvoch línii agresívnych nádorových buniek prostaty s indukovanou rezistenciou voči zinku s využitím metód hlbokého učenia, ako aj interpretácia klasifikačných procesov. Dataset pozostáva z viac ako 750 snímok, ktorých akvizícia prebiehala s využitím metódy optickej difrakčnej tomografie. Táto mikroskopická metóda umožnila neinvazívne snímanie buniek v natívnom stave. V práci bola implementovaná konvolučná neurónová sieť ResNet-50, spolu s metódami vizualizácie klasifikačných procesov pomocou lokalizačných máp (Grad-CAM a metóda postupnej oklúzie obrazu). Dve bunkové línie použité v štúdiu sieť klasifikuje s presnosťou 98,08%, agresívny fenotyp rezistentný voči zinku s presnosťou 96,08%. Lokalizačné mapy a manuálne segmentačné masky ohraničujúce regióny bunky (hranica bunky, jadrá, jadierka) umožnili analýzu subcelulárnych regiónov, ktorej výsledkom je zistenie, že rozhodujúcim regiónom bunky pre správnu klasifikáciu je oblasť cytoplazmy. Dôvodom je pravdepodobne variabilný počet vezikúl v cytoplazme, ich veľkosť, celková veľkosť buniek a morfológická štruktúra ich cytoplazmatickej membrány v závislosti na príslušnosti k danému fenotypu.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

konvolučné neurónové siete, hlboké učenie, klasifikácia obrazov, lokalizačné mapy, nádorové bunky

ABSTRACT

Classification of microscopic cancer cell images finds its use in wide variety of biological and medical applications. This work aims to classify two lines of aggressive tumor prostate cells with induced zinc resistance using deep learning methods, and provide an interpretation of occurring classification processes. Dataset consists of more than 750 images, whose acquisition was performed using optical diffraction tomography. This microscopy method allowed for non-invasive cell imaging in their native state. This work shows an implementation of a convolutional neural network, along with methods for visualization of classification processes used to generate localization maps (Grad-CAM and an occlusion-based method). The neural network classifies two prostate cell lines used in study with an accuracy of 98,08% and the aggressive zinc-resistance phenotype with an accuracy of 96,08%. Localization maps and manual segmentation masks of cell borders, nuclei and nucleoli allowed for analysis of sub-cellular regions, which indicates that the decisive region for correct classification is the region of cytoplasm. This is most likely the result of variable vesicle count in cytoplasm, their size, as well as the overall cell size and the morphological structure of their cytoplasmic membrane depending on a given phenotype.

KEYWORDS

convolutional neural networks, deep learning, image classification, localization maps, cancer cells

MAJERČÍK, Jakub. *Klasifikace nádorových buněk pomocí hlubokého učení*. Brno, 2021, 50 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedúci práce: Ing. Tomáš Vičar

VYHLÁSENIE

Vyhlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému „Klasifikace nádorových buněk pomocí hlubokého učení“ som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce, s využitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej bakalárskej práce ďalej vyhlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušil autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomý následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich autorského zákona Českej republiky č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníka Českej republiky č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autora

POĎAKOVANIE

Rád by som poďakoval vedúcemu semestrálnej práce pánovi Ing. Tomášovi Vičarovi, rovnako tak konzultantovi pánovi MUDr. Jaromírovi Gumulcovi, Ph.D za odborné vedenie, konzultácie, trpezlivosť a podnetné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	10
1 Nádorové bunky prostaty a ich meranie	11
2 Umelé neuronové siete	14
2.1 Architektúry sietí	15
2.2 Učenie neurónových sietí	16
2.2.1 Optimalizačné algoritmy	17
2.3 Konvolučné neurónové siete	20
3 Klasifikácia pomocou hlbokého učenia	24
3.1 ResNet-50	24
3.2 Metódy interpretácie klasifikačných procesov	25
3.2.1 Grad-CAM	25
3.2.2 Metóda oklúzie obrazu	26
3.3 Metriky evaluácie klasifikačných modelov	26
4 Akvizícia dát	28
4.1 Snímanie a anotácia dát	28
5 Navrh a implementácia	31
5.1 Predspracovanie dát	31
5.2 Trénovanie siete	31
5.3 Vizualizácia pomocou lokalizačných máp	32
5.4 Interpretácia klasifikačných procesov	33
6 Výsledky a diskusia	36
6.1 Vizualizácia a interpretácia pomocou lokalizačných máp	37
Záver	42
Literatúra	43
A Ukážky lokalizačných máp metódy Grad-CAM	47
B Ukážky lokalizačných máp metódy oklúzie	48
C Ukážky segmentačných masiek	49
D Obsah priložených súborov	50

Zoznam obrázkov

2.1	Schéma umelého neurónu	14
2.2	Schéma viacvrstvovej neurónovej siete.	16
2.3	Základná architektúra CNN.	20
2.4	Ukážka podvzorkovania pomocou max a average pooling.	22
2.5	Reziduálne spojenie	23
3.1	Schéma siete ResNet-50.	24
3.2	Grad-CAM lokalizačné mapy.	26
3.3	Vizualizácia pomocou metódy oklúzie	27
4.1	Príklady typických buniek.	29
4.2	Šedotónové 2D reprezentácie a segmentačné masky.	30
5.1	Priebeh trénovania sietí.	32
5.2	Postupne prekrývaný obraz v algoritme oklúzie.	34
5.3	Modifikované binárne segmentačné masky.	34
5.4	Blokova schéma finálneho algoritmu.	35
6.1	Ukážky lokalizačných máp.	37
6.2	Maximálne hodnoty intenzity lokalizačných máp.	39
A.1	Ukážky lokalizačných máp metódy Grad-CAM.	47
B.1	Ukážky lokalizačných máp metódy oklúzie.	48
C.1	Ukážky segmentačných masiek.	49

Zoznam tabuliek

6.1	Priemerné validačné úspešnosti klasifikácie jednotlivých modelov. . .	36
6.2	Kombinácia matíc zámen.	36
6.3	Sumarizácia parametrov intenzity lokalizačných máp.	39
6.4	Priemerné hodnoty maxím, hodnoty prvého (Q1) a tretieho (Q3) kvartilu refrakčného indexu.	40
6.5	Priemerné hodnoty plochy bunky, solidity bunky a RI v oblasti cytoplazmy.	41

Úvod

V posledných rokoch sme boli svedkami výraznej popularizácie strojového učenia, ktoré postupne umožňuje strojom plniť úlohy pôvodne vykonávané človekom. Z tohto pokroku ťažia rôzne odbory, medzi nimi aj biológia a medicína. Pomocou pokročilých metód počítačového videnia je v súčasnosti možné klasifikovať či segmentovať rôzne medicínske obrazy.

Klasifikácia mikroskopických obrazov buniek nachádza široké uplatnenie v súčasnej biológii a medicíne; môže napomôcť histologickým analýzám, či identifikácii vzácných typov buniek vo veľkých populáciách, a tým prispieť k upresneniu diagnózy a voľbe vhodnejšieho terapeutického postupu. Táto práca sa zaoberá klasifikáciou agresívnych nádorových buniek prostaty s experimentálne indukovanou rezistenciou voči zinku [1] pomocou konvolučných neurónových sietí. Bunky rezistentné voči zinku vykazujú, naproti bunkám, z ktorých boli odvodené, zvýšenú mieru agresivity in vitro, ako dokladá práca Kratochvílovej et al [2]. Cieľom bakalárskej práce je implementácia neurónovej siete schopnej nie len klasifikovať bunkovú líniu a agresívny bunkový typ, ale aj identifikovať subcelulárne oblasti buniek významné pre klasifikáciu a tým, na základe dát z mikroskopických obrazov, asociované s agresívnym fenotypom buniek. Na snímanie obrazov sú použité bunky v natívnom stave - živé, nefixované - pomocou inovatívnej techniky optickej difrakčnej tomografie.

Akvizícia a anotácia mikroskopických obrazov prebiehali v spolupráci s kolegom z ročníka, Michalom Špačkom, na Ústave Patologickej Fyziológie Lekárskej Fakulty Masarykovej Univerzity

1 Nádorové bunky prostaty a ich meranie

Rakovina prostaty je druhým najčastejšie diagnostikovaným typom nádorových ochorení. Prevalencia rakoviny prostaty stúpa s vekom, prevažne teda postihuje starších mužov. Zvyčajne však reaguje na liečbu a po správnej lokalizácii môže byť úplne liečiteľná. Rýchlosť rastu nádorov sa líši, od veľmi pomalej až po stredne rýchlu. Miera prežitia niektorých pacientov môže byť predĺžená, a to aj napriek metastázam do vzdialených oblastí. Pochopenie biochemických ciest, kde je metabolizmus zinku významným faktorom, je kľúčové pre zvládanie tohto a iných typov rakoviny [3]. Táto práca sa venuje štúdiu dvoch línii nádorových buniek prostaty (PC-3 a 22Rv1) a z nich odvodených zinok-rezistentných variantov. Základnou charakteristikou rozlišujúcou tieto typy buniek je miera migrácie, z ktorej ďalej vyplýva aj ich agresivita. Na kvantifikáciu miery migrácie boli pri analýze týchto buniek použité nasledujúce metódy:

xCelligence cell migration assay umožňuje kontinuálne merania invazivity a migrácie s použitím elektronickej integrovanej Boydenovej komory. Boydenova komora sa skladá z dvoch kompartmentov oddelených membránou, ktorá reprezentuje fyzickú bariéru, ktorú môžu bunky prekonať iba aktívnou migráciou. xCelligence využíva elektrickú impedanciu, pomocou ktorej kvantifikuje zmeny *label-free* metódou. Bunky sú umiestnené do prvého kompartmentu Boydenovej komory a aktívnou migráciou k chemoatraktantu postupne prestupujú membránou do druhého kompartmentu. Po prechode membránou sú zachytené zlatými impedančnými elektródami. Tento princíp umožňuje veľmi citlivé a reprodukovateľné kontinuálne meranie migrácie buniek [4].

Wound healing assay (Scratch assay) je jednoduchou metódou štúdia migrácie buniek *in vitro*. Základné kroky zahŕňajú vytvorenie "rany" v monovrstve buniek, nasnímanie obrazov na začiatku a v určených intervaloch počas migrácie buniek na ucelenie rany, a porovnanie snímok pre kvantifikáciu miery migrácie [5].

Colony forming assay je *in vitro* test prežitia buniek. Je založený na schopnosti jedinej bunky narásť do kolónie (minimálne 50 buniek). Metóda testuje každú bunku v populácii a jej schopnosť nekonečného delenia. Colony forming assay je vhodnou metódou na zistenie efektivity rôznych cytotoxických agens [6].

V práci Kratochvílovej et al [2] bolo aplikovaním metódy xCelligence cell migration assay zistené, že zinok-rezistentné varianty oboch bunkových línii (PC-3 aj 22Rv1) vykazujú vyššiu mieru individuálnej migrácie ako ich nerezistentné náprotivky. Práca Raudenskej et al [7] poukazuje na vyššiu mieru kolektívnej migrácie PC-3 zinok-rezistentných buniek, čo bolo preukázané scratch testom. Pomocou colony forming assay bolo ďalej zistené, že PC-3 zinok-rezistentné bunky majú zvýšenú schopnosť zakladať nové kolónie. U buniek línie 22Rv1 rezistentných voči zinku sa

však táto vlastnosť nepreukázala. Všetky spomenuté merania indikujú zvýšenú agresivitu nádorov zinok-rezistentných variánt rakovinových buniek prostaty *in vitro*, a to najmä línie PC-3. Z tohto plyní zvýšené riziko metastáz do celého organizmu a teda zníženie šance na vyliečenie pacienta. Je preto kľúčové včas odhaliť prítomnosť práve agresívnejších zinok-rezistentných buniek. Jedným z cieľov práce je automatická klasifikácia agresívnejších variantov s využitím metód strojového učenia.

Optická difrakčná tomografia

Štúdie buniek, ako napr. histologické analýzy v patológii, často využívajú fixované, teda už neživé bunky, a to zavádza isté skreslenie. Táto práca sa venuje analýze živých buniek. Práca s nimi je však relatívne obtiažna, keďže sú priehľadné a je potrebné ich farbiť (staining). Špecifické farbenie ale do obrazov zavádza artefakty a chemické farbivá môžu mať v istých prípadoch až cytotoxický charakter. V práci bola preto použitá práve optická difrakčná tomografia na tzv. *label-free* snímanie.

Optická difrakčná tomografia (ODT) patrí medzi kvantitatívne fázové mikroskopické techniky, ktorá umožňuje meranie fázového posunu. Iné bežné techniky snímania využívajú optické rozdiely dráh na zobrazenie fázových variácií, ktoré sú v mikroskopii v svetlom poli len ťažko viditeľné. ODT naopak umožňuje kvantitatívne meranie fázových zmien. Výslednými charakteristikami merania sú hrúbka a refrakčný index (RI), z ktorých môže byť ktorákoľvek použitá ako výstupný parameter ODT [8].

Na snímanie buniek sa v práci používa mikroskop 3D Cell explorer od spoločnosti Nanolive, ktorý využíva ODT. Tento holotomografický mikroskop umožňuje snímanie bez akýchkoľvek špecifických procedúr, ktoré vyžadujú zdĺhavú prípravu vzoriek. Pracuje na podobnom princípe ako MRI alebo CT. Realizuje kompletne tomografické meranie refrakčného indexu v živých bunkách, umožňuje teda 3D *in vitro* snímanie na bunkovej alebo sub-celulárnej úrovni. Výstupom merania mikroskopom je 3D obraz s 96 rezmi v osi z. Keďže na meranie nie sú potrebné akékoľvek markery, pozorovanie je úplne neinvazívne [9].

Motivácia

Metódy hlbokého učenia, najmä založené na aplikácii konvolučných neurónových sietí, sú široko využívané v patológii pre evaluáciu histologických obrazov fixovaných buniek rakoviny. Aplikácie zahŕňajú klasifikáciu buniek (napr. B-lymfoblastov) a predikciu miery prežitia pacienta. Určenie včasnej diagnózy je kľúčové pre zlepšenie liečby a kvality života pacientov s rakovinou [10].

V tejto práci sú analyzované bunky v natívnom stave bez fixácie a špecifického farbenia unikátnym sledovaním pomocou modernej mikroskopickej metodiky. Ana-

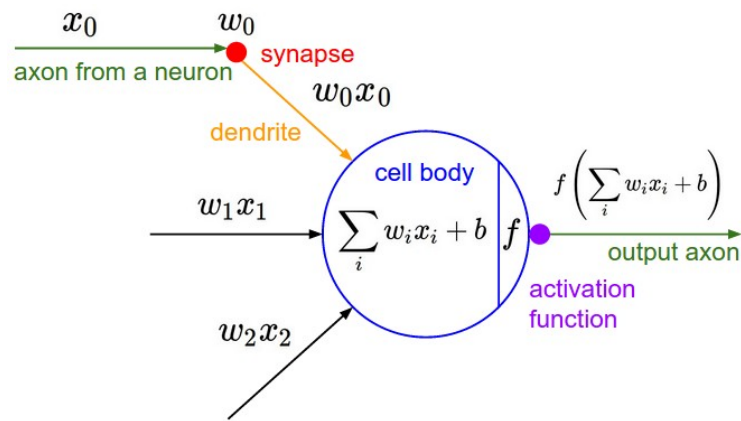
lýza nespočíva iba v klasifikácii agresívneho fenotypu s využitím metód hlbokého učenia. Cieľom je aj interpretácia tzv. *black box-u* neurónových sietí pomocou lokalizačných máp. To umožňuje identifikovať a pochopiť, ktoré oblasti buniek sú pre správnu klasifikáciu význačné a zodpovedné za príslušnosť buniek k danej línii a typu.

2 Umelé neuronové siete

Umelé neurónové siete (Artificial neural networks, ANNs) sú výpočetné systémy do veľkej miery inšpirované biologickými neurónovými sieťami. Cieľom takýchto systémov je simulácia rozhodovacích procesov centrálnej nervovej sústavy [11]. Často sa skladajú z veľkého množstva lineárnych alebo nelineárnych výpočtových prvkov prepojených medzi sebou a zoradených do vrstiev [12].

Perceptron

Neurón je základnou funkčnou jednotkou nervovej sústavy. Špecifickou funkciou nervovej bunky je tvorba a prenos signálov. Skladá sa z dendritov, ktoré sú zodpovedné za príjem signálov, tela (soma), ktoré signál spracuje a axónu, ktorým je výstupný signál prenášaný na dendrity ďalších neurónov pomocou synapsii. Matematický model neurónu (perceptron) bol inšpirovaný anatomickou a funkčnou štruktúrou biologického neurónu, ktorá je znázornená na Obr. 2.1 [13].



Obr. 2.1: Schéma umelého neurónu, prevzaté z [13].

Vstupné signály sú reprezentované vektorom $[x_1, x_2, x_3, \dots, x_n]^T$, analogicky ku elektrickým impulzom prechádzajúcich z axónov do dendritov. Tieto vstupy sú následne váhované vektorom váh $[w_1, w_2, w_3, \dots, w_n]$, ktoré reprezentujú synaptickú silu. Od sumy váhovaných vstupov je ďalej odčítaný tzv.aktivačný prah (bias). Výsledok vstupuje do aktivačnej funkcie, ktorá zaistí aktiváciu alebo inaktiváciu v danom rozsahu hodnôt, a je odoslaný na výstup. Tento proces je vyjadrený vzťahom [14]:

$$y = f\left(\sum_{i=1}^n w_i x_i - \theta\right), \quad (2.1)$$

kde y je finálny výstup neurónu, w_i je aktuálna váha, x_i daný vstup, θ bias a f vyjadruje aktivačnú funkciu.

Výber konkrétnej aktivačnej funkcie závisí na konkrétnom probléme a požadovaných výsledkoch riešenia. Platí však, že pri učení pomocou gradientného zostupu musí byť diferencovateľná v každom bode aby bolo možné vypočítať jednotlivé gradienty. V praxi sa najčastejšie používajú tieto funkcie [15] [16]:

- **Sigmoidu** je možné nájsť vo výstupných vrstvách sietí. Je využívaná na predikciu výstupov založených na pravdepodobnosti v binárnych klasifikačných úlohách, alebo pri logistickej regresii.

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}}, \quad H_f = (0, 1), \quad (2.2)$$

- **Hyperbolický tangent** je aktivačná funkcia používaná najmä v rekurentných neurónových sieťach pre spracovanie jazyka a rozpoznávanie reči.

$$f(x) = \tanh(x), \quad H_f = (-1, 1), \quad (2.3)$$

- **ReLU** je najširšie využívanou funkciou pre aplikácie hlbokého učenia, najmä v oblasti konvolučných neurónových sietí. Výhodou je, že funkcia je takmer lineárna, teda vykazuje nižšiu výpočetnú náročnosť oproti sigmoide a hyperbolickému tangentu.

$$f(x) = \max(0, x), \quad H_f = \langle 0, \infty \rangle, \quad (2.4)$$

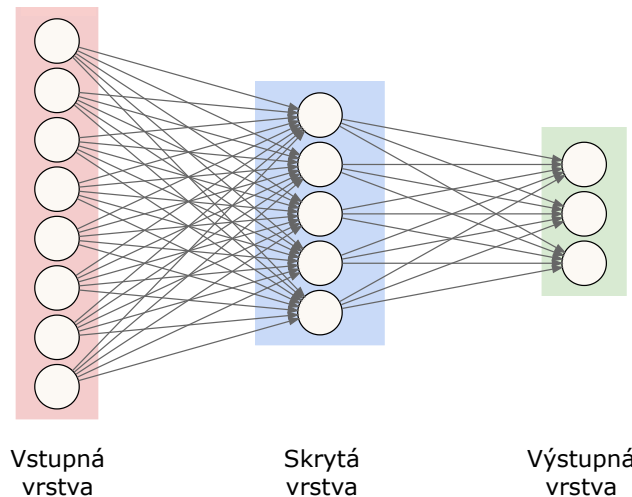
- **Softmax** aktivačná funkcia počíta distribúciu pravdepodobnosti z vektora reálnych čísel. Výstup nadobúda hodnoty v rozsahu od 0 do 1, zo súčtom všetkých rovnému 1. Na rozdiel od sigmoidy sa softmax používa na výstupnej vrstve siete pri klasifikácii do viacerých tried.

$$\sigma(z)_j = \frac{e^{z_j}}{\sum_{k=1}^K e^{z_k}} \quad \text{pre } j = 1, \dots, K, \quad H_f = (0, 1). \quad (2.5)$$

2.1 Architektúry sietí

Architektúrou neurónovej siete je definovaný spôsob akým su jej jednotlivé neuróny usporiadané medzi sebou. Štruktúra siete sa dá vo všeobecnosti rozdeliť na tri základné časti ilustrované na obrázku 2.2:

- *Vstupná vrstva*, ktorá prijíma informácie z vonkajšieho prostredia. Jej vstupy sú zvyčajne normalizované pre rovnomerné zastúpenie všetkých príznakov.
- *Skryté vrstvy*, zodpovedné za získavanie vzorov, na základe ktorých vieme danú úlohu vyriešiť. Čím viac skrytých vrstiev sieť obsahuje, tým komplexnejšie vzory bude schopná odhaliť.
- *Výstupná vrstva*, ktorej úlohou je vytvoriť finálny výstup celej umelej neurónovej siete.



Obr. 2.2: Schéma viacvrstvovej neurónovej siete, upravené podľa [17].

Vzhľadom na vzájomné prepojenia neurónov a usporiadanie vrstiev je možné architektúry rozdeliť na dopredné siete (informácia sa šíri iba v jednom smere), rekurentné siete (niektoré výstupy sú vrátené na vstup) a tzv. "mesh" siete (priestorové rozloženie neurónov reprezentuje ich váhy) [14]. V tejto práci budú využité dopredné neurónové siete.

2.2 Učenie neurónových sietí

Učenie, teda iteratívna aktualizácia váh, predstavuje základnú vlastnosť umelých neurónových sietí. Spočíva v minimalizácii chybovej funkcie, ktorá určuje rozdiel medzi výstupom siete a požadovaným výstupom. Rozoznávame tri základné typy učenia:

Učenie s učiteľom (supervised learning) predpokladá dostupnosť požadovaných výstupov pre každý vstup. Každý tréningový element teda pozostáva zo vstupného signálu a označenia korešpondujúceho výstupu. Počíta sa chybová funkcia, ktorá určuje do akej miery sa výstup siete líši od požadovaného výstupu. Na základe tejto funkcie sú váhy následne aktualizované. Sieť sa považuje za naučenú v okamihu, keď chybová funkcia dosiahne minimálnu hodnotu. Táto práca využíva metódy učenia s učiteľom, konkrétne pomocou optimalizačných metód využívajúcich gradient. Nevýhodou tohoto postupu je nutnosť časovo náročnej anotácie obrazových materiálov.

Učenie bez učiteľa (unsupervised learning) nevyžaduje nijakú informáciu o predpokladaných výstupoch. Sieť takýmto spôsobom hľadá vnútornú štruktúru dát, na základe ktorej ich rozdeľuje do skupín, ktoré neboli vopred definované. Jasnou

výhodou tohoto procesu je absencia zdĺhavej anotácie, čo však súčasne prináša isté nevýhody, ako napr. znížená kontrola nad priebehom učenia.

Reinforcement learning je formou učenia s učiteľom kedy má sieť k dispozícii informáciu o správnosti výstupu, nie však jeho konkrétnu hodnotu [14] [18].

Chybové funkcie

Chybové funkcie hrajú významnú rolu v návrhu algoritmov strojového učenia a zvyšovaní ich úspešnosti. V tejto práci bola použitá krížová entropia.

Krížová entropia (cross-entropy alebo log loss) meria úspešnosť klasifikačného modelu, ktorého výstupy sú v rozmedzí od 0 do 1. Jej hodnota sa zvyšuje so zvyšujúcim sa rozdielom pravdepodobnosti predikcie k triede a triedy samotnej:

$$-\sum_{c=1}^M y_{o,c} \log(p_{o,c}), \quad (2.6)$$

kde M predstavuje počet tried, y predstavuje binárny indikátor (0 alebo 1) príslušnosti pozorovania o k triede c , p predstavuje predikovanú pravdepodobnosť príslušnosti pozorovania o k triede c . Najčastejšie ide o výstup softmax-u. So zvyšujúcou sa pravdepodobnosťou vzorky predikovanej správne sa znižuje hodnota chyby. Hodnota chyby pomaly klesá ak je správna pravdepodobnosť predikcie blízka 1, a rýchlo stúpa so znižujúcou sa správnou pravdepodobnosťou predikcie [19].

Transfer learning

Bežné algoritmy strojového učenia sa zväčša zaoberajú izolovanými úlohami. Naproti tomu ľudia majú vrodenu schopnosť prenášať naučené vedomosti medzi rôznymi úlohami. Cieľom *transfer learning-u* je vyvinuť metódy na prenos vedomostí naučených pri iných úlohách a použiť ich na zlepšenie učenia aktuálnej úlohy [20].

Transfer learning v klasifikácii obrazových dát nachádza uplatnenie najmä s využitím databázy ImageNet. Databáza obsahuje viac ako 3,2 milióna anotovaných obrázkov rozdelených do viac ako 5000 kategórií [21]. Klasifikátory je možné na ImageNet-e predtrénovať a naučiť všeobecne použiteľné príznaky. Prvotné trénovanie konvolučných neurónových sietí a následná adaptácia neučených príznakov na novú úlohu sa stalo štandardom na riešenie širokej škály nielen klasifikačných problémov. Siete predtrénované na ImageNet-e, v porovnaní s nepredtrénovanými sieťami, dosahujú neporovnateľne lepšie výsledky [22].

2.2.1 Optimalizačné algoritmy

Optimalizačné metódy sú zodpovedné za postupnú úpravu parametrov siete, konkrétne váh a prahu, s cieľom minimalizácie hodnoty chybovej funkcie. Pri neuró-

nových sietah sú najpoužívanějšími optimalizačnými algoritmami metódy založené na gradiente. Gradient je v matematike diferenciálny operátor, ktorý je definovaný ako derivácia funkcie s viacerými vstupnými premennými. Viaceré premenné definujú vektor v priestore danom ich počtom. Vektor parciálnych derivácií všetkých premenných sa nazýva gradient [23]. V problematike neurónových sietí sa preto využíva na zistenie smeru a hodnôt o aké je potrebné zmeniť vstupné premenné na minimalizáciu chybovej funkcie. Gradient teda určuje o aké hodnoty je potrebné upraviť váhy w a prahy θ jednotlivých neurónov, tým pádom jednotlivé aktivácie a , ktoré priamo ovplyvňujú chybovú funkciu J . Na každej vrstve pre každý neurón siete je potrebné vypočítať 2 parciálne derivácie, a to $\partial J / \partial w_{jk}^l$ a $\partial J / \partial \theta_j^l$, kde index l určuje danú vrstvu siete, a indexy j a k pozíciu daného neurónu. Z parciálnych derivácií je zostrojený gradientný vektor, ktorý je vstupom pre optimalizačné algoritmy [24].

Táto práca je zameraná na učenie s učiteľom, do ktorého spadajú napr. nižšie popísané optimalizačné algoritmy.

Metóda gradientného zostupu

Gradientný zostup (Gradient descent) je jedným z najpopulárnejších a najviac využívaných metód. Tento optimalizačný algoritmus minimalizuje chybovú funkciu $J(\theta)$ úpravou parametrov v smere záporného gradientu chybovej funkcie $\nabla J(\theta)$. Krok učenia η definuje rýchlosť učenia. Jedna iterácia aktualizácie parametrov sa dá zapísať vzťahom:

$$\theta = \theta - \eta \cdot \nabla J(\theta). \quad (2.7)$$

Nevýhodou tohto prístupu je skutočnosť, že váhy sa aktualizujú až po výpočte gradientu v celom data-sete. Doba potrebná na konvergenciu k (lokálnemu) minimu je teda relatívne dlhá a algoritmus je výpočtovo náročný. Z tohto dôvodu nie je vhodný pri použití datasetu, ktorý sa nezmestí do pamäte. Gradientný zostup taktiež neumožňuje tzv. on-line aktualizáciu parametrov [25] [26].

Stochastický gradientný zostup

Stochastický gradientný zostup (Stochastic gradient descent - SGD) pracuje analogicky, ale parametre upravuje pre náhodne vybraný trénovací vzor podľa vzťahu:

$$\theta = \theta - \eta \cdot \nabla J(\theta; x^{(i)}; y^{(i)}), \quad (2.8)$$

kde $x^{(i)}$ predstavuje trénovací vzor a $y^{(i)}$ požadovaný výstup. SGD je preto výrazne rýchlejší a nevyžaduje toľko pamäte ako klasický gradientný zostup. Náhodné premiešanie data-setu je pri použití tejto metódy dôležitým krokom predspracovania.

Dáta zoradené podľa nejakého vzoru by mohli spôsobiť kolísanie gradientu, a tým spomaliť alebo úplne znemožniť konvergenciu [25] [26].

Mini-batch gradientný zostup

Mini batch gradientný zostup aktualizuje parametre pre každý tzv. mini-batch, ktorý obsahuje n trénovacích vzorov:

$$\theta = \theta - \eta \cdot \nabla J(\theta; x^{(i:i+n)}; y^{(i:i+n)}). \quad (2.9)$$

Týmto spôsobom (i) redukuje kolísanie pri úprave parametrov, čím dosahuje stabilnejšiu konvergenciu; (ii) využíva optimalizované maticové operácie súčasných knižníc na hlboké učenie, ktoré umožňujú veľmi efektívne výpočty gradientov. Bežná veľkosť mini-batch-u býva v rozmedzí od 8 do 256, no pri konkrétnej aplikácii sa líši. Pri trénovaní neurónovej siete býva väčšinou vybraný mini-batch gradientný zostup, pričom výraz SGD je použitý aj pri implementácii mini-batch-u. Túto metódu úpravy parametrov pre každý mini-batch využívajú aj ďalšie optimalizačné algoritmy, ako napr. Momentum a Adam opísané nižšie. [25].

Momentum

SGD má problémy v oblastiach chybovej funkcie, kde sú zložky gradientu v jednom smere výrazne vyššie ako v inom. V týchto situáciach iba osciluje a nekonverguje ďalej ku globálnemu minimu. Momentum je metóda, ktorá pomáha urýchliť SGD vo vhodnom smere a znižuje jeho oscilácie. Žiadaný efekt je zaistený pridaním nového hyperparametra γ . Momentum aktualizáčného vektoru minulého kroku sa pričíta k aktuálnemu aktualizáčnému vektoru:

$$v_t = \gamma v_{t-1} + \eta \cdot \nabla J(\theta), \quad (2.10)$$

parametre sa potom upravujú podľa:

$$\theta = \theta - v_t. \quad (2.11)$$

Hodnota γ býva zvyčajne nastavená na hodnotu 0,9. Momentum sa zvyšuje pre dimenzie, ktorých gradienty majú rovnaký smer, a naopak znižuje pre dimenzie s meniacimi sa smermi gradientu [25] [26].

Adam

Adaptive Moment Estimation je optimalizačná metóda, ktorá počíta adaptívne kroky učenia pre každý parameter. Pracuje s momentami prvého a druhého rádu,

kde prvé momentum je momentum popísané vyššie, druhé slúži pre normalizáciu jednotlivých dimenzií gradientu. Hodnoty oboch momentov sú akumulované a použité na aktualizáciu parametrov učenia:

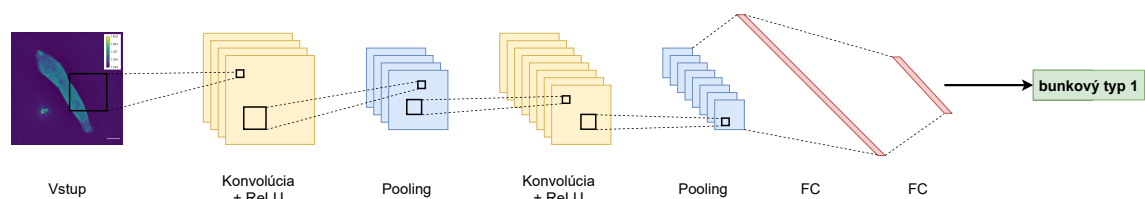
$$\theta_{t+1} = \theta_t - \frac{\eta}{\sqrt{\hat{v}_t + \epsilon}} \hat{m}_t, \quad (2.12)$$

kde \hat{m}_t predstavuje odhad prvého momenta a \hat{v}_t odhad druhého momenta. Adam je jedným z najlepších optimalizačných algoritmov pre hlboké učenie. Je výpočetne efektívny, konverguje relatívne rýchlo a odstraňuje problém vysokej odchylky pri aktualizácii parametrov [25] [26].

2.3 Konvolučné neurónové siete

Konvolučné neurónové siete (Convolutional neural networks - CNNs) patria medzi dopredné siete, teda fungujú podobne ako klasické ANN. Do každého neurónu vstupuje informácia, neurón vykoná nejakú matematickú operáciu a vyprodukuje výstup. Na vstupe však predpokladajú obrazové dáta. Neuróny CNN sú usporiadané do 3D štruktúry, priestorového rozmeru vstupu (výška a šírka) a hĺbky. Výška a šírka predstavujú priestorové dimenzie obrazu a hĺbka predstavuje počet príznakových máp [27].

Architektúra týchto sietí má množstvo variantov, no vo všeobecnosti pozostáva z konvolučných a pooling (podvzorkovacích) vrstiev zoskupených do blokov. Po niekoľkých blokoch nasleduje jedna alebo viac plne prepojených vrstiev, viď Obr. 2.3 [28].



Obr. 2.3: Základná architektúra CNN.

Konvolučná vrstva

Konvolučná vrstva je najdôležitejším prvkom CNN. Slúži ako extraktor príznakov, teda sa učí reprezentovať vzory vstupného obrazu. Parametre konvolučnej vrstvy pozostávajú zo sady filtrov (kernelov), ktorých hodnoty môžeme považovať za váhy. Každý filter predstavuje jeden neurón, na danej pozícii obrazu zdieľa váhy so všetkými ostatnými pozíciami obrazu. Oblasť vymedzená filtrom na danej pozícii sa

nazýva *receptive field* a vyjadruje rozmery filtra. 2D konvolúciou (*), teda posunom filtra W veľkosti $k \times k$ cez výšku a šírku vstupného obrazu x vzniká príznaková mapa (feature map) Y , ktorej každý prvok je vyjadrený vzťahom [29]:

$$Y_{a,b} = x * W = \sum_{i=0}^k \sum_{j=0}^k x_{a+i,b+j} \cdot W_{i,j}. \quad (2.13)$$

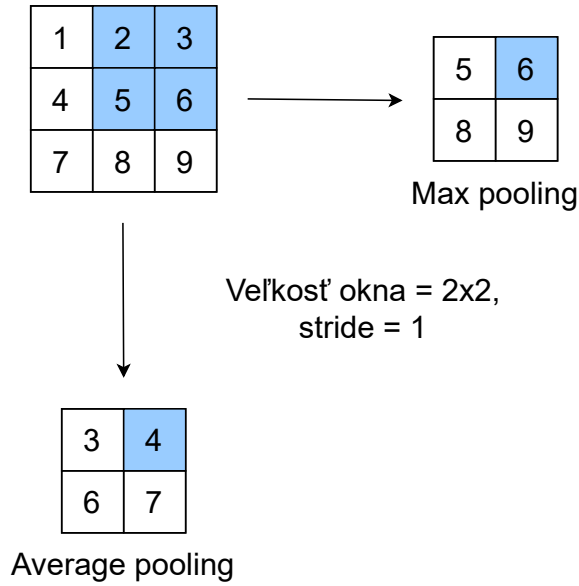
Pri každej pozícii filtra na vstupe sú použité rovnaké váhy. Zdieľaním váh je, naproti plne prepojeným vrstvám, výrazne znížený počet parametrov a taktiež je zaistená translačná invariantnosť (konvolučný filter detkuje vzory na akejkolvek pozícii v obraze). Rozmery filtra sú často relatívne malé, napr. 3×3 alebo 5×5 . Dôvodom je, že je výpočtovo menej náročné viac krát zopakovať konvolúciu vstupu s menším filtrom, ako menej krát s väčším filtrom. Ich tretí rozmer (hĺbka) nadobúda hodnotu tretej dimenzie vstupného obrazu (napr. 3 pre RGB obraz na vstupnej vrstve), alebo je daný počtom príznakových máp z predchádzajúcej konvolučnej vrstvy. Hodnoty filtrov sa v priebehu učenia siete menia, aby dokázali odhaliť rôzne vzory v daných oblastiach obrazu [13] [27]. Počet kernelov určuje jeden z hyperparametrov, tzv. *depth*. Ovplyvňuje množstvo príznakových máp, a teda schopnosť rozoznania vzorov daného modelu. Ďalšími hyperparametrami sú tzv. *stride*, určujúci krok posunu filtra a tzv. *zero-padding*, ktorý určuje pridávanie núl okolo vstupného obrazu pre zachovanie pôvodných rozmerov v príznakovej mape. Keby bol *stride* nastavený napríklad na hodnotu 1, *receptive fields* by sa veľmi prekrývali, a výsledné aktivácie by boli veľké. Naopak vysoké hodnoty *stride-u* znižujú mieru prekrytia a preto znižujú priestorové rozmery výstupu konvolučnej vrstvy. *Zero-padding* je jednoduchým procesom vyplňania okrajov vstupu nulami a efektívnou metódou zaistenia kontroly dimenzionality výstupu. [27]. Poskladaním príznakových máp cez tretiu dimenziu vzniká výstup, ktorý ďalej vstupuje do nelineárnej aktivačnej funkcie, najčastejšie ReLU [28].

Pooling vrstva

Účelom pooling vrstvy je zníženie priestorového rozlíšenia príznakových máp, a tým redukcia počtu parametrov a výpočtovej náročnosti modelu. Pooling najčastejšie využíva výber buď najvyššej alebo priemernej hodnoty z oblasti určenej filtrom o veľkosti 2×2 a stride-om 2. Poolingový kernel prechádza po vstupe podobne ako konvolučný filter, princíp je znázornený na Obr. 2.4 [27].

Plne prepojená vrstva

Všetky neuróny plne prepojenej (fully connected - FC) vrstvy sú prepojené s neurónmi prilahlých vrstiev, rovnako ako pri klasických ANN. Jej úlohou je, pri klasifi-



Obr. 2.4: Ukážka podvzorkovania pomocou max a average pooling.

kačnej úlohe, na výstupe podať pravdepodobnosti príslušnosti vstupu k jednotlivým triedam [27].

Batch normalizácia

Batch normalizácia (BN) je technika normalizácie aktivácii skrytých vrstiev konvolučných neurónových sietí. Podobne ako optimalizačné algoritmy využíva výpočty cez mini-batch, konkrétne normalizáciu aktivácii na nulový priemer. BN prispieva k zrýchleniu tréningu, dovoľuje použiť vyššie kroky učenia a zvyšuje generalizačnú schopnosť daného modelu. Pre vstup $I_{b,c,x,y}$ s veľkosťou mini-batch-u b , počtom kanálov c a rozmermi x, y je algoritmus vyjadrený vzťahom:

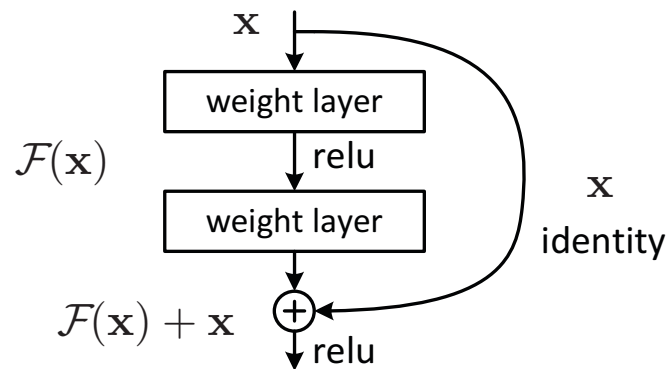
$$O_{b,c,x,y} \leftarrow \gamma \frac{I_{b,c,x,y} - \mu_c}{\sqrt{\sigma_c^2 + \epsilon}} + \beta_c, \quad (2.14)$$

kde $O_{b,c,x,y}$ vyjadruje normalizovaný výstup a μ_c priemernú aktiváciu v kanále c . Algoritmus následne vydolí centrovanú aktiváciu smerodajnou odchylkou σ_c spolu s konštantou ϵ . Po normalizácii nasleduje transformácia pomocou parametrov γ a β_c , ktorých hodnoty sú aktualizované počas tréningu. Tendencia zlepšovať presnosť a rýchlosť tréningu, zapríčinila obľúbenosť batch normalizácie v prakticky všetkých aplikáciách [30].

Reziduálne spojenie

Reziduálne (skip) spojenie preskakuje jednu alebo viac vrstiev neurónovej siete. Umožňuje priamy tok gradientov sieťou bez prechodu nelineárnymi aktivačnými

funkciami, ilustrované na Obr. 2.5. Spojenie obsahuje iba funkciu identity, ktorej výstup sa pričíta k výstupu bloku vrstiev s aktivačnými funkciami. Implementácia spojenia s funkciou identity zlepšuje učenie elimináciou problému miznúceho gradientu bez akéhokoľvek spomalenia siete. Nepridáva totiž žiadny nový parameter. Pre sieť je taktiež aproximácia zmeny od identity jednoduchšia ako aproximácia funkcie samotnej [31].



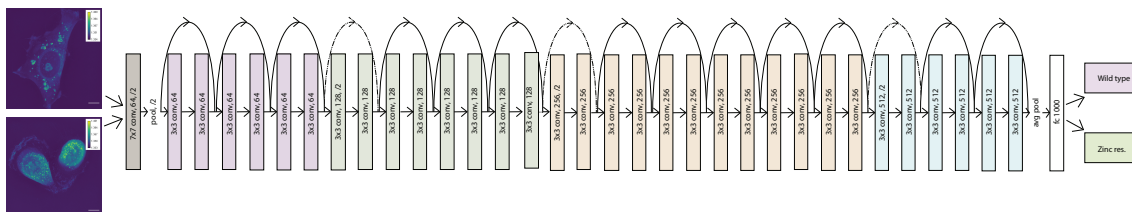
Obr. 2.5: Reziduálne spojenie, prevzaté z [31].

3 Klasifikácia pomocou hlbokého učenia

Klasifikácia obrazov spadá do počítačového videnia, spočíva v priradení tzv. *labelu* ku vstupnému obrazu. Hlboké konvolučné neurónové siete sa ukázali ako jeden z najlepších prístupov k riešeniu klasifikačnej úlohy na obrazových dátach. Medzi široko používané architektúry patria napr. VGG, DenseNet, GoogLeNet, Inception alebo ResNet. Pre účely tejto práce bola zvolená architektúra ResNet, konkrétne sieť ResNet-50.

3.1 ResNet-50

ResNet-50 patrí do skupiny reziduálnych neurónových sietí. Ide o hlboké konvolučné siete, kde halvnou myšlienkou je preskočiť bloky konvolučných vrstiev použitím tzv. skip spojení. Použitie týchto spojení umožňuje trénovať mimoriadne hlboké siete. Pred implementáciou ResNet-u bolo trénovanie veľmi hlbokých sietí zložité kvôli problému miznúceho gradientu (pri veľkom množstve vrstiev využívajúcich istú aktivačnú funkciu sa gradient chybovej funkcie blíži nule, čo komplikuje trénovanie siete) [32]. Konvolučné vrstvy obsahujú najmä filtre o veľkosti 3×3 a riadia sa dvomi základnými pravidlami: (i) pre rovnakú veľkosť výstupnej príznakovej mapy majú vrstvy rovnaký počet filtrov; a (ii) ak sa veľkosť príznakovej mapy zmenší na polovicu, počet filtrov sa zdvojnásobí. Podvzorkovanie je zabezpečené priamo konvolučnými vrstvami so stride-om 2. Sieť je ukončená average pooling vrstvou a 1000-neurónovou plne prepojenou vrstvou so softmaxom. Na Obr. 3.1 je znázornená schéma siete so skip spojeniami. Plné šípky reprezentujú spojenia, pri ktorých je vstup a výstup rovnako veľký, zatiaľ čo prerušované šípky reprezentujú spojenia, pri ktorých sa rozmery zväčšujú a prebieha konvolúcia so stride-om 2 [31]. ResNet-50 obsahuje 50 vrstiev.



Obr. 3.1: Schéma siete ResNet-50; vstupné obrazy buniek vľavo, výstupné triedy vpravo. Zmena farby vrstiev reprezentuje pooling.

3.2 Metódy interpretácie klasifikačných procesov

Hlboké neurónové siete podávajú vynikajúce výkony v oblasti počítačového videnia. Problémom však ostáva interpretácia procesov, ktoré sa odohrávajú v týchto systémoch. Zostavenie systémov, ktoré sú schopné vyjasniť jednoducho *prečo predikujú to, čo predikujú* je nutné, a to z niekoľkých dôvodov. V situácii kedy je model menej pokročilý ako človek nám interpretabilita umožní identifikovať a sledovať chyby, na základe ktorých je možné model zlepšovať. Ak je model pokročilejší ako človek (napr. bot na hranie šachu), môže učiť človeka ako sa zlepšovať [33].

Metódy používané pre interpretáciu sú Grad-CAM a metóda postupnej oklúzie obrazu. V tejto práci boli použité obe s cieľom identifikovať subcelulárne zóny buniek významné pre klasifikáciu do príslušných tried.

3.2.1 Grad-CAM

Gradient-weighted Class Activation Mapping je metóda vizualizácie regionov vstupného obrazu, ktoré sú kľúčové pre predikciu modelov. Využíva informáciu o gradientoch poslednej konvolučnej vrstvy pre zistenie dôležitosti každého neurónu v rozhodovacom procese [34].

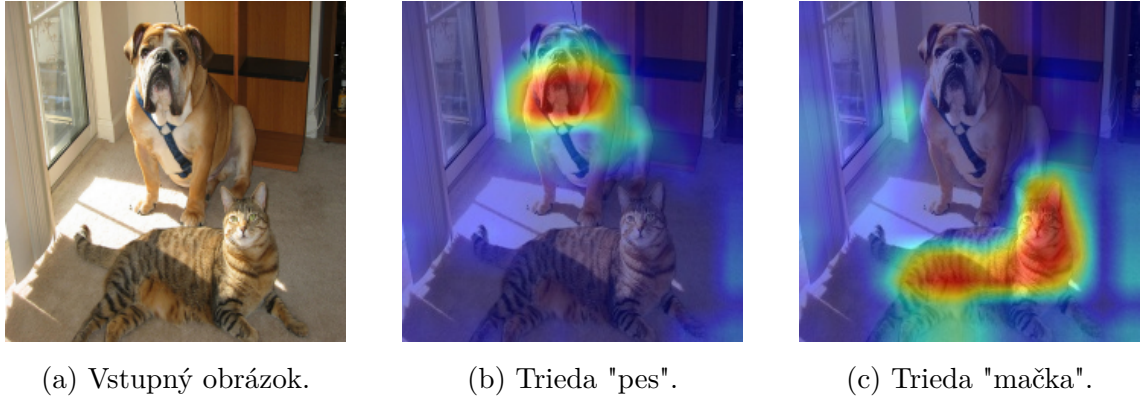
Prvým krokom konštrukcie lokalizačnej mapy je výpočet gradientu skóre pre triedu c , y^c podľa príznakovej mapy A^k konvolučnej vrstvy. Na tieto gradienty je aplikovaný globálny average-pooling. Váhy neurónov α_k^c , ktoré vyjadrujú význam príznakovej mapy k pre triedu c , získame podľa vzťahu:

$$\alpha_k^c = \frac{1}{Z} \sum_i \sum_j \frac{\partial y^c}{\partial A_{ij}^k}. \quad (3.1)$$

Finálnu Grad-CAM lokalizačnú mapu $L_{Grad-CAM}^c$ získame váhovanou kombináciou príznakových máp a aplikáciou ReLU:

$$L_{Grad-CAM}^c = ReLU\left(\sum_k \alpha_k^c A^k\right). \quad (3.2)$$

Funkcia ReLU je aplikovaná pretože zaujímavé sú iba vzory, ktoré majú pozitívny vplyv na danú triedu, teda pixely, ktorých intenzita je zvýšená za účelom zvýšenia y^c . Bez ReLU by lokalizačná mapa mohla zvýrazniť aj oblasti obrazu, ktoré nijak neprispievajú ku správnej klasifikácii, a tým znížiť úspešnosť. Príklady vizualizácie sú zobrazené na Obr. 3.2 [33] [34]. Oblasť obrázku s najvyššou intenzitou reprezentuje pixely kľúčové ku správnej klasifikácii.



Obr. 3.2: Ukážka špecifických lokalizačných máp vygenerovaných pomocou algoritmu Grad-CAM pri klasifikácii, prevzaté z [33].

3.2.2 Metóda oklúzie obrazu

Metóda postupnej oklúzie obrazu spočíva v systematickom zakrývaní časti obrazu štvorcom a pozorovaní výstupu klasifikátora. Ak štvorec zakryje región obrazu dôležitý pre správnu klasifikáciu, pravdepodobnosť príslušnosti k danej triede klesne. Na každej pozícii tohto štvorca je preto vypočítaná pravdepodobnosť predikcie. Z týchto pravdepodobností je vygenerovaná lokalizačná mapa, ako je znázornené na Obr. 3.3. Lokalizačná mapa vygenerovaná metódou oklúzie umožňuje, podobne ako metódou Grad-CAM, zvýrazniť dôležité regióny obrazu [35]. Metóda je jednoduchá na pochopenie a implementáciu, no nevýhodami tohto prístupu sú napr.:

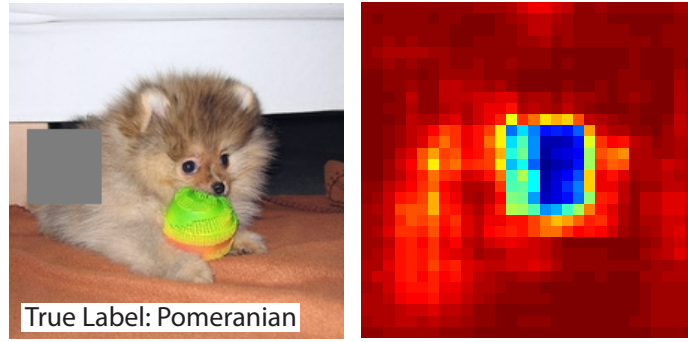
- Veľkosť štvorca, ktorým je obraz zakrývaný nie je daná, ovplyvňuje výsledné rozlíšenie lokalizačnej mapy a pre každý prípad môže byť vhodná iná veľkosť.
- Proces trvá relatívne dlhú dobu, pretože štvorec musí postupne prejsť celým vstupným obrazom. Takto upravený obraz zakaždým vstupuje do siete, čo zvyšuje výpočetnú náročnosť [36].

3.3 Metriky evaluácie klasifikačných modelov

Základnými metrikami evaluácie klasifikačných modelov sú F_1 skóre a presnosť (Accuracy), vychádzajúce z matíc zámen.

Accuracy určuje úspešnosť klasifikácie na základe merania všetkých správne zaradených prípadov. Najväčšie využitie nachádza pri datasetoch s rovnomerným rozložením tried. V prípade, že FN má veľký dopad nie je táto metrika veľmi vhodná. Je vyjadrená vzťahom:

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN}. \quad (3.3)$$



(a) Vstupný obrázok.

(b) Heat mapa.

Obr. 3.3: Príklad vizualizácie pomocou metódy oklúzie obrazu. Najnižšie hodnoty pixelov reprezentuje modrá farba, najvyššie červená. Ak štvorec zakryl oblasť hlavy psa, pravdepodobnosť príslušnosti k danej triede by klesla. Pozadie nehrá významnú rolu, prevzaté z [35].

F_1 **skóre** umožňuje lepšie meranie nesprávne predikovaných prípadov ako *Accuracy*. Preto je vhodné ho použiť v prípadoch, kedy sú FN a FP významné. Používa sa na evaluáciu binárnych klasifikátorov. Pre jeho vyjadrenie je najprv potrebné definovať 2 štatistické parametre: *Precision* a *Recall*. *Precision* alebo pozitívna prediktívna hodnota (PPV) vyjadruje pravdepodobnosť pravdivej predikcie (pomer medzi pravdivo pozitívnymi a všetkými pozitívnymi):

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}. \quad (3.4)$$

Recall alebo senzitivita (TPR) vyjadruje pravdepodobnosť správnej predikcie (pomer medzi pravdivo pozitívnymi a reálne pozitívnymi):

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}. \quad (3.5)$$

F_1 skóre je následne definované ako harmonický priemer pozitívnej prediktívnej hodnoty a senzitivity [37]:

$$F_1 = \frac{2 \cdot Precision \cdot Recall}{Precision + Recall}. \quad (3.6)$$

4 Akvizícia dát

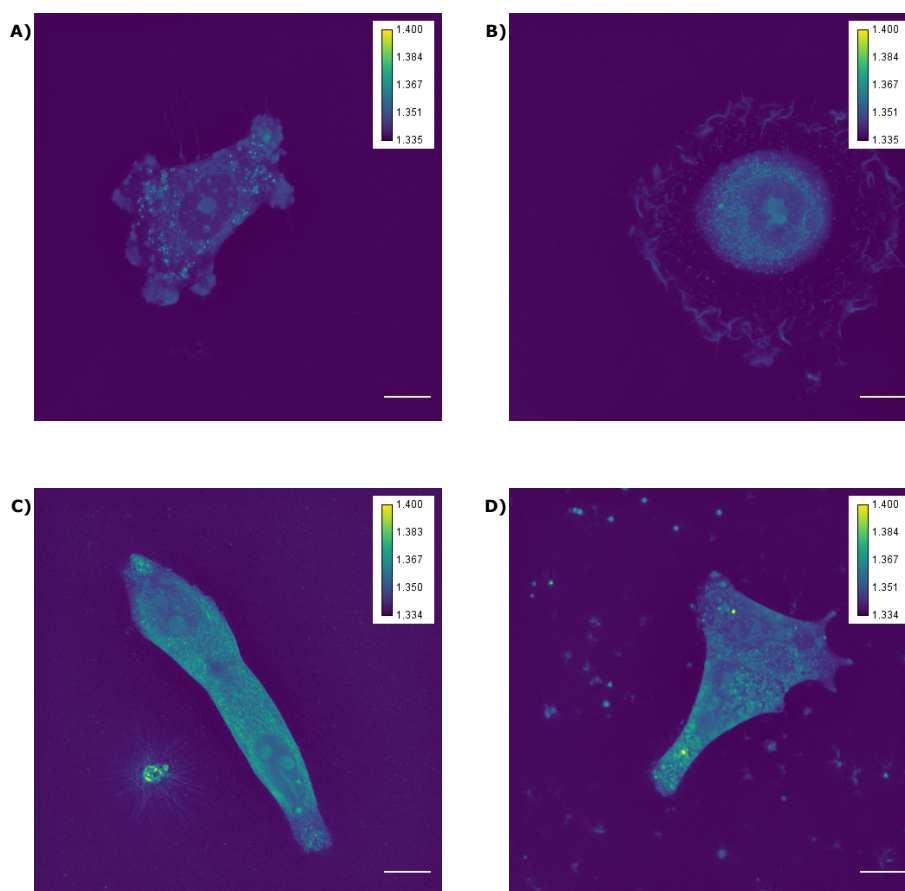
V tejto práci boli použité dve komerčne dostupné bunkové línie. PC-3 ľudská epitelová bunková línia bola získaná z adenokarcinómu prostaty stvrteho stupňa a metastáz v kostiach. V práci reprezentuje model agresívneho adenokarcinómu. 22Rv1 je ľudská epitelová bunková línia rakoviny prostaty získaná z primárneho karcinómu prostaty, použitá ako model nízko agresívneho karcinómu. Bunkové línie boli zakúpené u Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko). Obe tieto línie boli modifikované vytvorením tzv. zinok-rezistentných variantov (bližšie Holubová et al [1]). Tieto zinok-rezistentné varianty boli charakteristické vyššou mierou invazivity a migrácie *in vitro*. Pôvodné bunky boli označené ako *Wild-Type*, zinok-rezistentné ako *Zn-resistant*.

PC-3 aj 22Rv1 bunky boli kultivované na Ústave Patologickej Fyziológie, Lekárskej Fakulty, Masarykovej Univerzity. PC-3 bunky boli kultivované v Ham's F12 médiu s 10% FBS, zatiaľ čo na kultiváciu 22Rv1 buniek bolo použité RPMI-1640 médium s 10% FBS. Obe médiá boli obohatené o antibiotiká (penicilín 100 μM /ml a streptomycín 0.1 mg/ml). Bunky boli udržiavané v inkubátore pri konštantnej teplote 37°C, vlhkosti 60% s 5% CO₂ (Sanyo, Japonsko). Zinok-rezistentné bunky boli kultivované s prídavkom ZnSO₄, konkrétne 50 μM pre PC-3 a 400 μM pre 22Rv1. Pasáže 22Rv1 buniek sa pohybovali v rozmedzí od 25 do 35, pasáže línie PC-3 od 15 do 25 [38].

4.1 Snímanie a anotácia dát

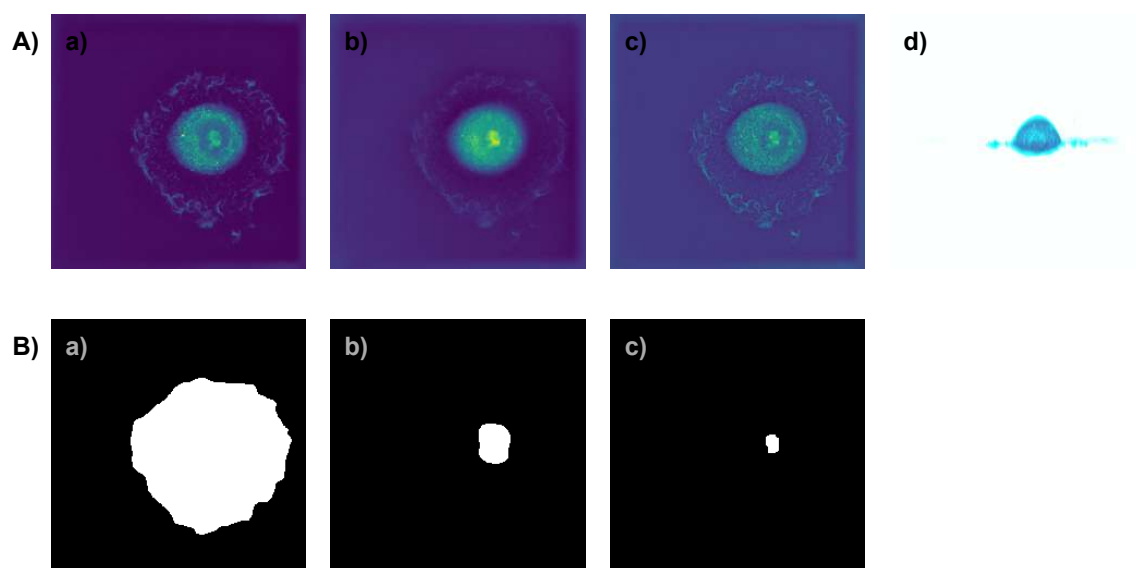
Akvizícia mikroskopických obrazov prebehla pomocou Nanolive 3D Cell Explorer holotomografického mikroskopu s 60x/0.8 objektívom, ktorý umožňuje merať kvantitatívny refrakčný index. Umožňuje teda neinvazívnu akvizíciu 3D dát [39]. Refrakčný index oboch médií bol nameraný digitálnym refraktometrom (Kruss, DR201) na hodnotu 1,335. Všetky 4 typy buniek (PC-3 Wild type, PC-3 Zn-resistant, 22Rv1 Wild type a 22Rv1 Zn-resistant) boli kultivované v oddelených ibidi μ -Slide Luer 0.8 komorách. Vďaka tomu bolo možné jednoducho vytvoriť 4 unikátne data-sety obsahujúce po takmer 200 3D obrazov. Každý obraz je zložený z 96 rezov a pri akvizícii bol označený číslom rezu, v ktorom bolo možné najlepšie vidieť jednotlivé bunkové štruktúry. Okrem mikroskopu bol na akvizíciu potrebný aj softvér, konkrétne *Steve*, poskytnutý spoločnosťou Nanolive určený k matematickému spracovaniu hologramov, vytvárajúci 3D 32-bitové tiff súbory. Celkom bolo nasnímaných viac ako 750 zorných polí. V týchto zorných poliach bolo nasnímaných približne 1500 buniek. Rozmery zorného poľa boli 94x94x35 μm . Príklady typických buniek sú na Obr. 4.1. Dáta boli manuálne segmentované s označením týchto regiónov: okraj bunky, jadrá a

jadierka. Segmetácia prebiehala pomocou programu ImageJ. Výsledkom manuálnej anotácie teda boli 3 binárne masky pre každé zorné pole, s ukážkami na Obr. 4.2 B).



Obr. 4.1: Príklady typických buniek. A) PC-3 Wild type; B) PC-3 Zinc resistant; C) 22Rv1 Wild type; D) 22Rv1-400. Scale bar indikuje $10\mu\text{m}$.

Udávané rozlíšenie mikroskopu v osi Z je 400 nm, pri snímaní bol intracelulárny obsah buniek obsiahnutý v 10-20 rezoch a použitie všetkých 96 rezov by bolo relatívne výpočtovo náročné. Bolo preto vhodné vytvoriť jednokanálové 32-bitové 2D reprezentácie pôvodného $512 \times 512 \times 96$ 3D obrazu: (i) spriemerovaním cez 3. dimenziu, (ii) max-projekciou cez 3. dimenziu a (iii) výberom rezu z najvyššou hodnotou entropie, teda najostrejšieho rezu. Dáta modifikované týmto spôsobom obsahujú väčšinu informácii potrebných pre účely klasifikácie. Na Obr. 4.2 A) sú ukážky všetkých 2D reprezentácii pôvodného 3D obrazu spolu s XZ projekciou bunky PC-3 *Zn-resistant* a na Obr. 4.2 B) k nej prislúchajúce binárne masky manuálnej segmentácie.



Obr. 4.2: A) Príklad 2D reprezentácii pôvodného 3D obrazu bunky PC-3 Zn-resistant; a) max-projekcia, a) mean-projekcia, a) Rez s najvyššou hodnotou entropie, d) XZ projekcia. B) Binárne masky manuálnej segmentácie bunky PC-3 Zn-resistant; a) hranica bunky, b) jadro, c) jadierko.

5 Navrh a implementácia

Implementácia všetkých algoritmov prebiehala v programovom prostredí Python s použitím machine learning knižnice PyTorch. Ako najvhodnejšia architektúra konvolučnej neurónovej siete na účely tejto práce bola zvolená sieť ResNet-50. Pre porovnanie klasifikačných úspešností bola implementovaná predtrénovaná sieť na databáze ImageNet [21] s využitím princípov *transfer learningu*, ako aj nepredtrénovaná sieť.

5.1 Predspracovanie dát

Surové obrazy bolo vhodné normalizovať. Na tento účel bola použitá štandardizácia odčítaním priemeru a vydelením smerodajnou odchyľkou, pričom hodnoty priemeru a smerodajnej odchyľky boli vypočítané cez celý dataset pre každý typ parametrickej 2D reprezentácie separátne.

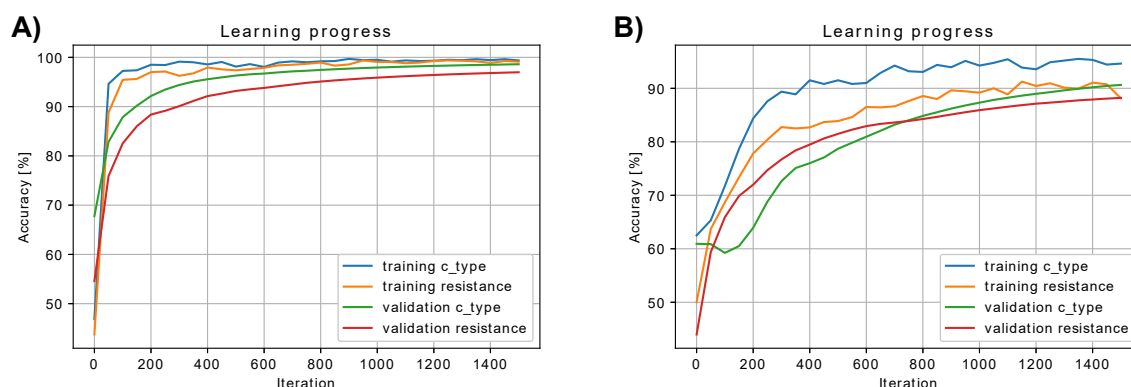
Na zvýšenie variability nameraného data-setu bola implementovaná augmentácia, ktorá pozostáva z nasledujúcich krokov: (i) pripočítanie náhodných hodnôt z predom definovaného intervalu, (ii) násobenie náhodnými hodnotami z predom definovaného intervalu, (iii) náhodné zaostrovanie a rozostrovanie a (iv) náhodné rotácie. Všetky parametre augmentácie boli nastavené na základe predchádzajúcej optimalizácie. Po augmentácii boli vstupné obrazy o veľkosti 512x512 náhodne orezané na oblasť o veľkosti 224x224 pixelov. Orezanie nebolo nutné, keďže po poslednej vrstve ResNet-u nasleduje average pooling, ktorý zabezpečí správne fungovanie pri vstupe akejkoľvek veľkosti [32]. Sieť však bola navrhnutá pre vstupné obrazy veľkosti 224x224, preto bol aplikovaný aj tento krok. Na dáta spadajúce do validačnej množiny bolo aplikované iba náhodné orezanie.

5.2 Trénovanie siete

Aby bolo možné klasifikovať obrazy buniek do dvoch kategórií naraz, bolo potrebné zmeniť počet výstupov siete ResNet-50 na 4. Prvé 2 reprezentujú príslušnosť k bunkovej línii (PC-3 a 22Rv1) a ďalšie 2 reprezentujú rezistenciu voči zinku (Wild-type a Zn-resistant). Upravená sieť teda naraz klasifikuje jeden obraz do dvoch kategórií. Trénovanie prebiehalo na všetkých troch vyššie spomenutých parametrických 2D obrazoch separátne, ako aj na ich kombinácii vytvorením 3-kanálového obrazu. Týmto spôsobom boli testované rôzne typy vstupov.

Data-sety oboch bunkových línii boli rozdelené v pomere 4:1 na trénovacie a testovacie množiny. Na tréning bola preto využitá 5-násobná krížová validácia aby sa zaistilo, že všetky obrazy budú postupne spadať do validačnej množiny a bolo možné na nich testovať. Všetky modely boli trénované s rovnakými parametrami

nastavenými na základe dôkladnej manuálnej optimalizácie. Počet iterácií tréovania bol nastavený hodnotu na 1500 (64 epoch) a batch size na 32. Parametre siete boli optimalizované pomocou algoritmu Adam. Počiatočný learning rate s hodnotou 0,0001 sa s využitím *scheduleru* znižoval pri iteráciách č. 750, 1250 a 1400 na jednu desatinu svojej pôvodnej hodnoty. Ako chybová funkcia bola použitá krížová entropia. Týmto spôsobom bolo vytvorených 20 rôznych modelov pre obe siete, pričom pre každý boli ukladané konkrétne náhodne vybrané validačné obrazy pre ďalšiu evaluáciu a generovanie lokalizačných máp. Priebehy tréovania všetkých modelov boli podobné, na ilustráciu je uvedený príklad grafu závislosti presnosti na priebehu tréovania jedného z modelov pre obe siete, zobrazený na Obr. 5.1.



Obr. 5.1: Priebehy tréovania jedného z modelov pri kombinácii všetkých 3 parametrických reprezentácií na vstupe; A) predtrénovaný ResNet-50, B) nepredtrénovaný ResNet-50. Zelená krivka reprezentuje validačnú presnosť klasifikácie bunkovej línie, červená validačnú presnosť klasifikácie rezistencie.

Tréovanie prebiehalo na vzdialenom serveri na Ústave Biomedicínskeho Inžinierstva VUT v Brne s nasledujúcimi špecifikáciami: Intel(R) Core i7 3.07 GHz CPU a 8GB GDDR5 NVIDIA GeForce GTX 1070 GPU. Výpočtový čas pre každý typ vstupu bol približne 120 minút, celková doba tréovania teda dosiahla približne 16 hodín.

5.3 Vizualizácia pomocou lokalizačných máp

Po pretrénovaní siete bol implementovaný algoritmus Grad-CAM [40] a metóda postupnej oklúzie obrazu. Keďže v niektorých prípadoch bunka presahuje výrez 224x224, vstupom do oboch metód je obraz v pôvodnej veľkosti aby lokalizačná mapa obsahovala ucelenú informáciu. Výstupom každej z metód sú dve lokalizačné mapy, ktoré korešpondujú s klasifikáciou bunkovej línie alebo rezistencie.

Implementácia metódy Grad-CAM

Algoritmus potrebný na implementáciu bol prevzatý a upravený z [40]. Pre správne fungovanie bolo potrebné pridať nový vstup, ktorý určuje daný typ generovanej lokalizačnej mapy (bunková línia alebo rezistencia). Nasledujúcim krokom bolo už iba normalizovať vstup podobne ako pri tréňovaní siete.

Implementácia metódy oklúzie obrazu

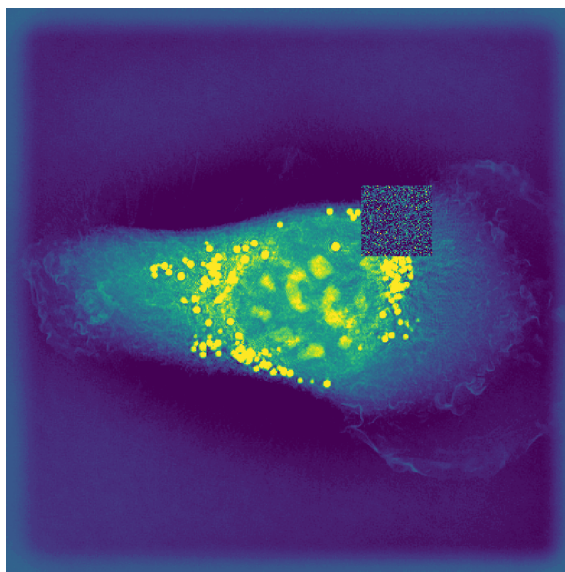
Pri metóde postupnej oklúzie bolo v prvom kroku potrebné definovať veľkosť štvorca, ktorým bude vstup postupne zakrývaný. Zvolená hodnota bola 32x32 pixelov. Do siete najprv vstupoval neprekrytý obraz, výstupom boli predikované triedy. Predikovaná trieda, teda trieda s najvyššou odozvou, bola využitá na generovanie oklúznej lokalizačnej mapy. V ďalšom kroku bol implementovaný cyklus, ktorý prechádza celým vstupom. V každej iterácii sa vstup prekryje štvorcom, ktorý je vyplnený šumom normálneho rozdelenia, ukážka na Obr. 5.2. Takto upravený obraz následne vstupuje do siete, ktorej výstup sa rozdelí na dve časti podľa typu klasifikácie. Pomocou indexov vyjadrených z výstupu neprekrytého obrazu sú vybrané korešpondujúce hodnoty výstupu prekrytého obrazu. Každá z hodnôt je ďalej zapísaná na prislúchajúce miesto vo výslednej lokalizačnej mape. Tento postup sa opakuje pri každej iterácii, až kým štvorec neprejde z ľavého horného do pravého dolného rohu vstupného obrazu. Krok posunu štvorca bol nastavený na hodnotu 8. Pre jednoduchšie porovnanie výsledkov dosiahnutých oboma metódami vizualizácie boli všetky hodnoty lokalizačnej mapy odčítané od 1. V opačnom prípade by vyzerali podobne ako na Obr. 3.3. Lokalizačné mapy zväčšené z pôvodnej veľkosti 64x64 na 512x512 boli, podobne ako pri metóde Grad-CAM, následne prekryté so vstupom.

Pomocou týchto vizualizácií je možné pozorovať, ktoré časti, prípadne orgány bunky sú charakteristické pre danú bunkovú líniu alebo typ.

Táto metóda generovania lokalizačných máp je veľmi výpočtovo náročná, a to najmä ak požadujeme výstup v relatívne vysokom rozlíšení. Pri veľkosti vstupu 512x512 pixelov a požadovanej veľkosti lokalizačnej mapy 64x64 pixelov bolo potrebné pre každý obraz vybaviť natrénovanú sieť až 4096-krát. Výpočtový čas pre jeden obraz bol viac ako 60 sekúnd, generovanie lokalizačných máp pre celý dataset teda trvalo približne 14 hodín.

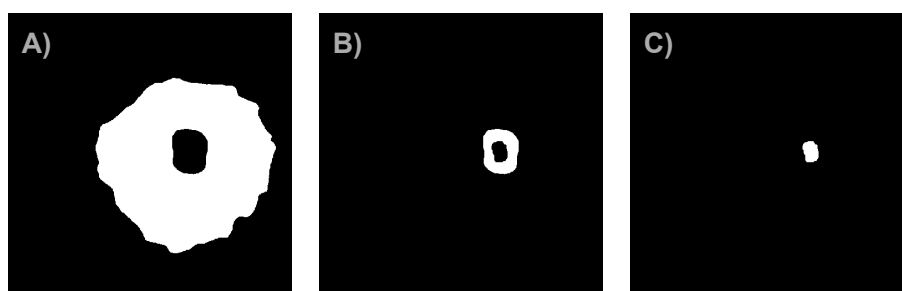
5.4 Interpretácia klasifikačných procesov

Pre interpretáciu klasifikačných procesov boli okrem lokalizačných máp potrebné aj binárne segmentačné masky, ktoré ohraničujú subcelulárne regióny jednotlivých buniek (celé bunky, jadrá, jadierka). Analýza prebiehala pomocou manuálnych masiek.



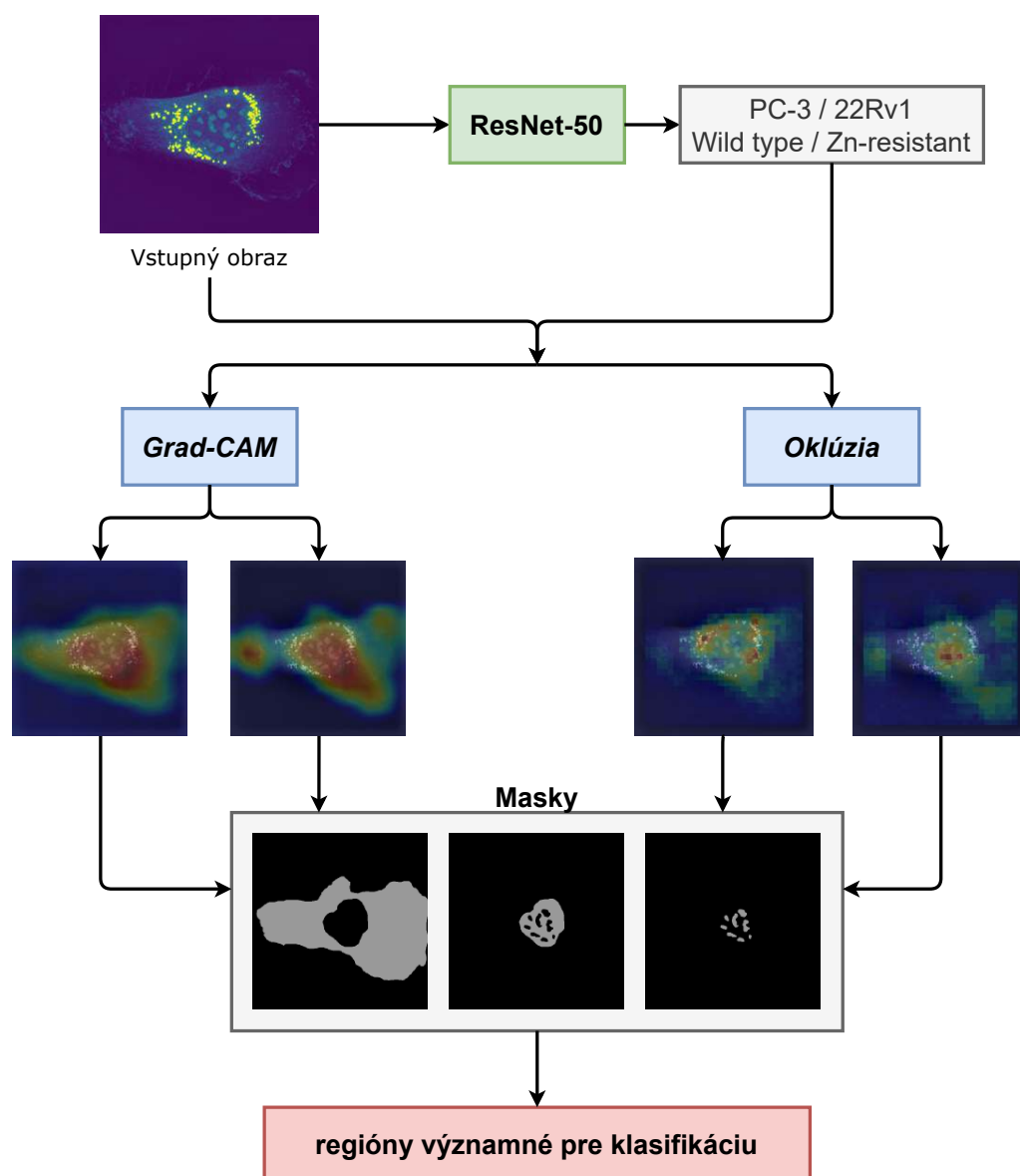
Obr. 5.2: Postupne prekrývaný obraz v algoritme oklúzie. Štvorec prechádzajúci plochou obrazu má veľkosť 32x32 pixelov a je vyplnený šumom normálneho rozdelenia.

Z týchto binárnych masiek boli pre účely interpretácie vyjadrené masky ohraničujúce oblasť cytoplazmy bunky, oblasť jadier bez jadriek a oblasť jadriek, znázornené na Obr. 5.4 s ďalšími ukážkami v prílohe na konci práce.



Obr. 5.3: Ukážka modifikovaných binárnych segmentačných masiek na účely interpretácie. A) cytoplazma, B) jadro bez jadriek, C) jadierka.

Nasledujúcim krokom bol návrh algoritmu pre kvantifikáciu rozdielov jednotlivých klasifikačných tried. Pre tento účel bola využitá intenzita lokalizačných máp a hodnoty refrakčného indexu (RI) v oblastiach vymedzených binárnymi maskami. Vo všetkých lokalizačných mapách a *surových* obrazoch boli postupne vymedzované oblasti podľa segmentačných masiek. V týchto oblastiach boli následne počítané hodnoty priemeru, maxima a smeodajnej odchylky. Pomocou zmienených štatistických parametrov prebiehala evaluácia a interpretácia. Bloková schéma kompletného návrhu algoritmu sa nachádza na Obr. 5.4.



Obr. 5.4: Bloková schéma celého priebehu finálneho algoritmu. Obrázok bunky vstupuje do siete ResNet-50, následne je spolu s jeho predikovanými slúži ako vstup do metód generujúcich lokalizačné mapy. V oblastiach vymedzených segmentačnými maskami je meraná intenzita máp. Na základe hodnôt intenzity sú predikované regióny dôležité pre klasifikáciu.

6 Výsledky a diskusia

Úspešnosť klasifikácie bola vyhodnocovaná separátne pre bunkovú líniu (PC-3 vs. 22Rv1) a rezistenciu (Wild-Type vs. Zn-resistant). V Tab. 6.1 je možné vidieť priemerné úspešnosti pre oba typy klasifikácie v závislosti na použitom vstupe. Predtrénovaná sieť dosahovala všeobecne lepšie výsledky, preto sa ďalšia analýza venuje iba nej. Predtrénovaná sieť bola použitá aj na generovanie lokalizačných máp. Najvyššia presnosť bola pozorovaná pri použití rezu s najvyššou hodnotou entropie ako vstupe, konkrétne 98,02% pri klasifikácii bunkovej línie a 96,08% pri klasifikácii rezistencie voči zinku. Presnosť klasifikácie rezistencie bola všeobecne nižšia, no vždy dosahovala hodnoty vyššie ako 94%. Z hodnôt v tabuľke je ďalej možné konštatovať, že použitie rôznych vstupných obrazov nemá výrazný vplyv na výslednú úspešnosť klasifikácie. Pre ďalšiu evaluáciu a generovanie lokalizačných máp bol však použitý rez z najvyššou hodnotou entropie.

Tab. 6.1: Priemerné validačné úspešnosti klasifikácie jednotlivých modelov [%] predtrénovanej aj nepredtrénovanej siete v závislosti na type klasifikácie a použitého vstupe, vyjadrené v priebehu tréningu siete.

Typ vstupu	Predtrénovaná		Nepredtrénovaná	
	Bunková línia	Rezistencia	Bunková línia	Rezistencia
Max-projekcia	97,93	95,14	90,18	83,35
Std-projekcia	97,90	94,42	90,09	82,91
Projekcia entropie	98,02	96,08	90,41	84,27
Kombinácia všetkých	98,25	95,47	90,74	83,58

Evaluácia výsledkov prebehla aj pomocou matíc zámen vyjadrených po natrénovaní siete na testovacích dátach. Tab. 6.2 kombinuje klasifikáciu bunkovej línie a rezistencie. Obe matice vznikli sčítaním matíc zámen charakterizujúcich predikcie na validačnej množine jednotlivých modelov.

Tab. 6.2: Kombinácia matíc zámen pre klasifikáciu bunkovej línie a rezistencie (hodnoty v zátvorkách).

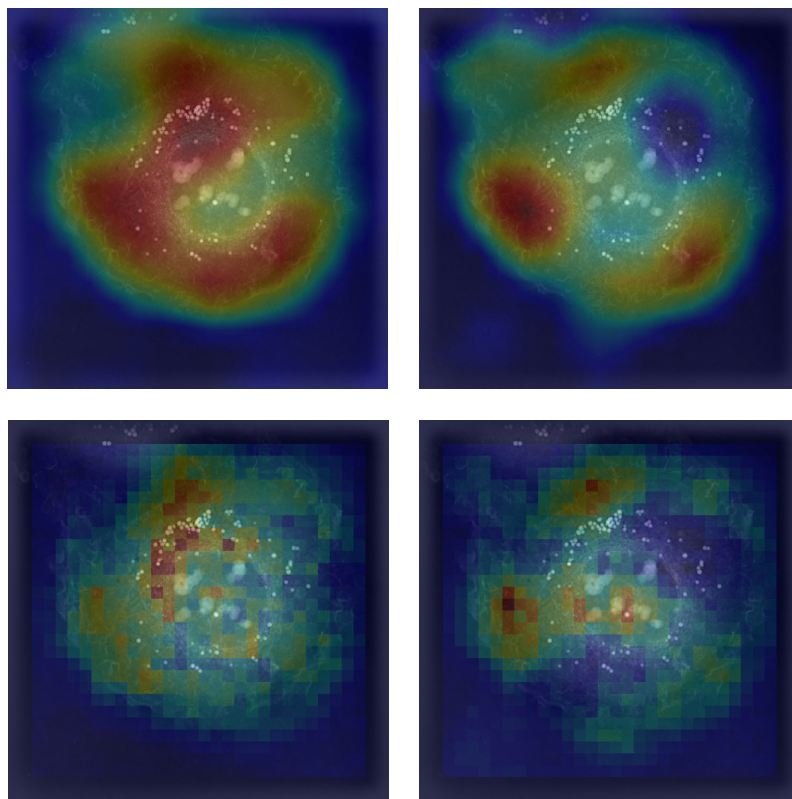
Správna / Predikovaná trieda	PC-3 (Wild type)	22Rv1 (Zn-resistant)
PC-3 (Wild type)	418 (349)	0 (2)
22Rv1 (Zn-resistant)	3 (6)	294 (358)

Z hodnôt matíc zámen boli vyjadrené jednotlivé F_1 skóre, pričom pri klasifikácii bunkovej línie dosiahlo hodnotu takmer 100%, pri klasifikácii rezistencie 98,41%.

6.1 Vizualizácia a interpretácia pomocou lokalizačných máp

S cieľom identifikovať, ktoré oblasti buniek sú významné pre klasifikáciu, a s tým asociované pre fenotyp *Zn-resistant*, boli vytvorené lokalizačné mapy. Ich intenzita bola následne porovnávaná v oblastiach vymedzených maskami manuálne a automaticky nasegmentovaných regiónov buniek (hranica bunky, jadrá a jadierka).

Každá bunka z datasetu spadá do 2 kategórii naraz (PC-3 alebo 22Rv1 a Wild type alebo zinok rezistentná). Z tohto dôvodu boli pre každý obraz vygenerované 2 lokalizačné mapy pre klasifikáciu bunkovej línie a rezistencie, a to oboma spomenutými spôsobmi (Grad-CAM a metóda postupnej oklúzie), viď na Obr. 6.1 s ďalšími ukážkami v prílohe na konci práce.



Obr. 6.1: Ukážky lokalizačných máp na bunke PC-3 Zinc resistant oboma metódami pre oba typy klasifikácie. Na prvom riadku podľa algoritmu Grad-Cam, na druhom podľa algoritmu oklúzie. V prvom stĺpci pre klasifikáciu bunkovej línie, v druhom pre klasifikáciu rezistencie voči zinku

Tab. 6.3 sumarizuje parametre vyjadrené na základe intenzity lokalizačných máp. Priemerné hodnoty intenzity lokalizačných máp v oblastiach vymedzených segmentačnými maskami sa naprieč výsledkami výrazne nelíšili, čo môže vypovedať o rov-

nako veľkých oblastiach s vysokou intenzitou vzhľadom na celkovú plochu jednotlivých regiónov. Zaujímavé sú však hodnoty maxím. Tie sú vizualizované aj pomocou box plotov na Obr. 6.2.

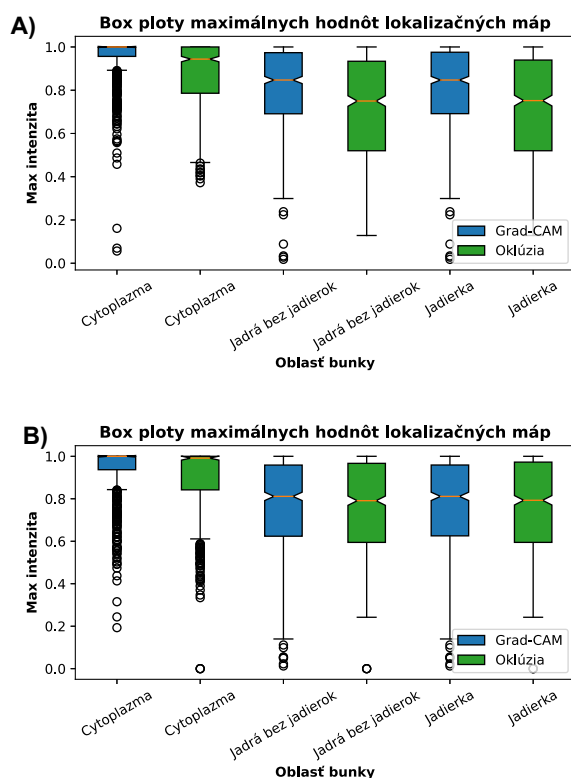
Výskyt vyššieho počtu odľahlých hodnôt v grafoch v regióne cytoplazmy, rovnako ako vyšších hodnôt smerodajnej odchylky v Tab. 6.3 v regióne cytoplazmy, indikuje, že pri menšine buniek nebol tento región rozhodujúci. Mohlo to byť spôsobené rovnomerným rozložením oblastí s vysokou intenzitou lokalizačných máp cez viaceré subcelulárne regióny. Na základe hodnôt maxím pri použití algoritmu Grad-CAM je možné vyvodiť záver, že pri klasifikácii bunkovej línie je najdôležitejším regiónom v bunke cytoplazma, zatiaľ čo najmenej vplyvnou oblasťou je jadro. Jadrá a jadierka však určite nie sú zanedbateľné s maximálnymi hodnotami vždy väčšími ako 0,71, natrénovaná sieť sa však častejšie sústredila práve na oblasť cytoplazmy. To môže byť spôsobené prítomnosťou vezikúl a ďalších bunkových štruktúr v tejto oblasti, ktoré sú pravdepodobne významné pre správne zaradenia bunky do danej kategórie, a teda charakteristické pre danú bunkovú líniu. Zóny s vysokou intenzitou boli často lokalizované v blízkosti jadra. V obrazoch ODT sú v okolí jadra pozorovateľné zreteľné štruktúry, mitochondrie a endoplazmatické retikulum, ktorých morfológické zmeny mohli byť rozpoznané neurónovou sieťou a prispeť k správnej klasifikácii. Ďalším možným výkladom výsledkov sú morfológické rozdiely medzi PC-3 a 22Rv1 bunkami. Niektoré bunky sú väčšie/menšie a viac/menej adherujú k podkladu ako iné, čím sa môže meniť štruktúra cytoplazmatickej membrány týchto buniek. Všetky spomenuté charakteristiky spadajú práve do oblasti cytoplazmy, preto sa odrazili aj na výsledkoch. Algoritmus postupnej oklúzie poukazuje na rovnaké závery. Oblasť cytoplazmy sa takisto javí ako najvýznamnejšia. Hodnoty priemeru sú pri tejto metóde všeobecne nižšie, čo je zapríčinené nižším počtom pixelov s vysokou intenzitou lokalizačných máp, ako demonštruje aj Obr. 6.1. Pri klasifikácii rezistencie voči zinku boli pozorované výraznejšie rozdiely medzi jednotlivými regiónmi bunky. Rovnako ako pri klasifikácii bunkovej línie, región cytoplazmy sa javí ako rozhodujúci. Je teda možné tvrdiť že elementy prítomné v oblasti cytoplazmy sú asociované s fenotypom *Zn-resistant*.

Uvedené závery potvrdzuje aj meranie refrakčného indexu (RI) v jednotlivých oblastiach, s konkrétnymi hodnotami v Tab. 6.4. Hodnoty RI dosahovali najvyšších maxím práve v oblasti cytoplazmy.

V Tab. 6.5 sú sumarizované priemerné hodnoty plochy buniek, ich solidity a priemerné hodnoty RI v oblasti cytoplazmy. Zinok-rezistentná varianta buniek línie PC-3 vykazuje viac ako dvoj-násobnú veľkosť. Táto skutočnosť bola pravdepodobne jedným z rozhodujúcich parametrov pre správnu klasifikáciu. So zvýšenou veľkosťou buniek sa zväčšujú aj prázdne oblasti buniek - oblasti s nízkou intenzitou v obrazoch ODT - oblasti s nízkym RI. Na Obr. 6.1 je možné pozorovať oblasť bunky vľavo dole

Tab. 6.3: Sumarizácia parametrov (priemer, maximum a smerodajná odchylka) vyjadrených na základe intenzity lokalizačných máp v jednotlivých oblastiach buniek pre oba typy klasifikácie.

	Oblasť buniek	Grad-CAM			Oklúzia		
		Mean	Max	Std	Mean	Max	Std
Klasifikácia bunkového typu	Cytoplazma	0,51	0,95	0,19	0,34	0,87	0,14
	Jadrá bez jadierok	0,52	0,81	0,13	0,34	0,71	0,12
	Jadierka	0,53	0,81	0,13	0,35	0,71	0,12
Klasifikácia rezistencie	Cytoplazma	0,47	0,94	0,20	0,36	0,90	0,14
	Jadrá bez jadierok	0,46	0,77	0,14	0,37	0,75	0,13
	Jadierka	0,46	0,77	0,14	0,37	0,76	0,13



Obr. 6.2: Box ploty maximálnych hodnôt intenzity lokalizačných máp vygenerovaných metódami Grad-CAM a oklúzie v oblastiach vymedzených segmentačnými maskami; A) pre klasifikáciu bunkovej línie, B) pre klasifikáciu rezistencie.

s vysokou intenzitou, najmä pri klasifikácii rezistencie sa javí ako rozhodujúca. Pri bunkách PC-3 *Wild type* sa takto rozsiahle prázdne oblasti nevyskytujú. Veľkosti buniek línie 22Rv1 oboch fenotypov sa naopak takmer nelíšia. Medzi rozhodujúce príznaky v obrazoch pre ich správnu klasifikáciu preto ich veľkosť nepatrí. Subjek-

Tab. 6.4: Priemerné hodnoty maxím, hodnoty prvého a tretieho kvartilu refrakčného indexu v jednotlivých oblastiach buniek vymedzených manuálne nasegmentovanými maskami.

Oblasť buniek	RI	Q1	Q3
Cytoplazma	1,390	1,375	1,403
Jadrá bez jadierok	1,371	1,363	1,378
Jadierka	1,372	1,363	1,378

tívna analýza lokalizačných máp buniek 22Rv1 však poukázala na dôležitosť oblastí v blízkosti okraja buniek tejto línie - cytoplazmatickej membrány. Jej morfológia sa pri viacerých vzorkách javila ako určujúci faktor pre správnu klasifikáciu.

Pre výklad parametra solidita je potrebné tento pojem definovať. Hodnoty solidity vyjadrujú pomer medzi celkovou plochou a konvexnou plochou:

$$Solidita = \frac{Celková\ plocha}{Konvexná\ plocha}. \quad (6.1)$$

Solidita kompletne konvexného útvaru má hodnotu 1 [41]. Analyzované bunky teda nie sú dokonale konvexné, na ich cytoplazmatickej membráne sú pozorovateľné výbežky. Nižšie hodnoty solidity korešpondujú s tzv. *blebbingom*, vydutím cytoplazmatickej membrány do vonkajšieho prostredia. Tieto hodnoty boli však vyjadrené na základe manuálne nasegmentovaných binárnych masiek, ktoré bunky neohraničujú dokonale. Preto je možné predpokladať, že reálne hodnoty solidity sú v skutočnosti nižšie a bunky nenadobúdajú tak konvexné tvary, ako vyplýva z nameraných hodnôt. Solidita sa na základe dát naprieč bunkovými typmi výrazne nelíši. Pre klasifikáciu však mohla byť významným parametrom, keďže do neurónovej siete vstupovali obrazy bez binárnych masiek. Sieť preto mohla extrahovať isté príznaky korešpondujúce práve s hodnotami solidity jednotlivých bunkových typov. Na základe dostupných dát však nie je možné túto hypotézu potvrdiť ani vyvrátiť.

Ako už bolo uvedené, z hodnôt v Tab. 6.4 vyplýva, že najvýznamnejším regiónom pre klasifikáciu je cytoplazma. Výrazným elementom v tejto oblasti sú vezikuly, ktorých početnejší výskyt bol pozorovaný pri Zinok-rezistentnej variante PC-3 buniek naproti PC-3 Wild type. Vezikuly majú v snímkoch optickej difrakčnej tomografie vysokú intenzitu, teda vysoké hodnoty RI. Preto je možné ich považovať za príznak významný pre klasifikáciu. Vyššie hodnoty priemerného RI v cytoplazme PC-3 Zn-resistant buniek ako ich Wild type náprotivku v Tab. 6.5, indikujú práve prítomnosť vezikúl vo vyššom počte. Je preto možné ich považovať za charakteristickú črtu PC-3 Zn-resistant buniek. Jednou z funkcií intracelulárnych vezikúl je intracelulárny transport špecifických molekúl, čo môže korešpondovať so zvýšenou mierou migrácie

Zn-resistant buniek, teda ich zvýšenou aktivitou a agresivitou. Závěry práce Leca et al [42] poukazujú na prepojenie výskytu vezikúl a agresivity nádorových buniek pankreasu. V práci Albina et al [43] bol potvrdený význam transportu špecifických molekúl vezikulami pre progresiu nádoru prostaty. Tieto zistenia podporujú prezentovanú teóriu vplyvu vezikúl na agresivitu buniek línie PC-3. Pri bunkách línie 22Rv1 tieto rozdiely RI nie sú až tak výrazné. 22Rv1 Zn-resistant totiž na základe tzv. colony forming assay v práci Raudenskej et al [7] netvorí viac kolónii ako bunky 22Rv1 Wild type. Miera ich migrácie po úprave zinkom nestúpa, preto sa nezvyšuje ani počet ich vezikúl.

Tab. 6.5: Priemerné hodnoty plochy bunky [μm^2], solidity bunky a priemerné hodnoty RI v oblasti cytoplazmy jednotlivých bunkových typov. Skratka *res* značí príslušnosť k fenotypu Zn-resistant.

	PC-3 WT	PC-3 res	22Rv1 WT	22Rv1 res
Plocha bunky	786,52	1646,72	437,78	413,70
Solidita	0,83	0,89	0,79	0,81
RI v cytoplazme	1,344	1,338	1,345	1,347

Záver

Bakalárska práca bola zameraná na automatickú klasifikáciu agresívnych nádorových buniek prostaty pomocou konvolučných neurónových sietí a následnú interpretáciu klasifikačných procesov pomocou lokalizačných máp a segmentačných masiek. Cieľom bolo tieto bunky správne zaklasifikovať a odhaliť subcelulárne regióny významné pre klasifikáciu.

Pre účely práce bol nameraný dataset obsahujúci približne 750 zorných polí obrazov dvoch línii buniek rakoviny prostaty a ich agresívnejších náprotivkov s experimentálne indukovanou rezistenciou voči zinku (PC-3 Wild type, PC-3 Zn-resistant, 22Rv1 Wild Type, 22Rv1 Zn-resistant). Akvizícia dát prebiehala pomocou modernej mikroskopickej metódy, optickej difrakčnej tomografie, ktorá je založená na meraní refrakčného indexu. To umožnilo prácu so živými nefixovanými bunkami bez akýchkoľvek farbív (label-free metóda). Celý dataset bol naanotovaný manuálnymi segmentačnými maskami ohraničujúcimi dôležité regióny bunky (celá bunka, jadrá, jadierka).

Následne bola implementovaná konvolučná neurónová sieť ResNet-50, pomocou ktorej boli mikroskopické obrazy buniek klasifikované do príslušných tried. Pri klasifikácii bunkovej línie bola presnosť 98,02% s F_1 skóre takmer 100%, pri klasifikácii rezistencie voči zinku 96,08% a 98,41%, v uvedenom poradí. Interpretácia klasifikačných procesov prebiehala pomocou lokalizačných máp, generovaných metódou Grad-CAM a metódou postupnej oklúzie spolu s manuálnymi segmentačnými maskami. Štatistická analýza lokalizačných máp a refrakčného indexu pôvodného snímku potvrdila, že najvýznamnejším regiónom pre klasifikáciu je cytoplazma. Jedným z elementov nachádzajúcich sa v cytoplazme sú vezikuly, ktorých zvýšený výskyt korešponduje so zvýšenou agresivitou buniek. Pri bunkách PC-3 Zn-resistant bol pozorovaný nárast počtu a veľkosti vezikúl, naproti PC-3 Zn.resistant. Vezikuly majú v obrazoch optickej difrakčnej tomografie vysokú intenzitu. Ďalším významným príznakom je veľkosť buniek, najmä pri línii PC-3, kde Zn-resistant varianta má priemerne viac ako dvoj-násobnú veľkosť. Pri klasifikácii buniek línie 22Rv1 bola charakteristická morfológia cytoplazmatickej membrány.

Výstupom práce je systém schopný klasifikácie mikroskopických obrazov nádorových buniek prostaty a interpretovacie procesov v tzv. *black boxe* neurónových sietí.

Literatúra

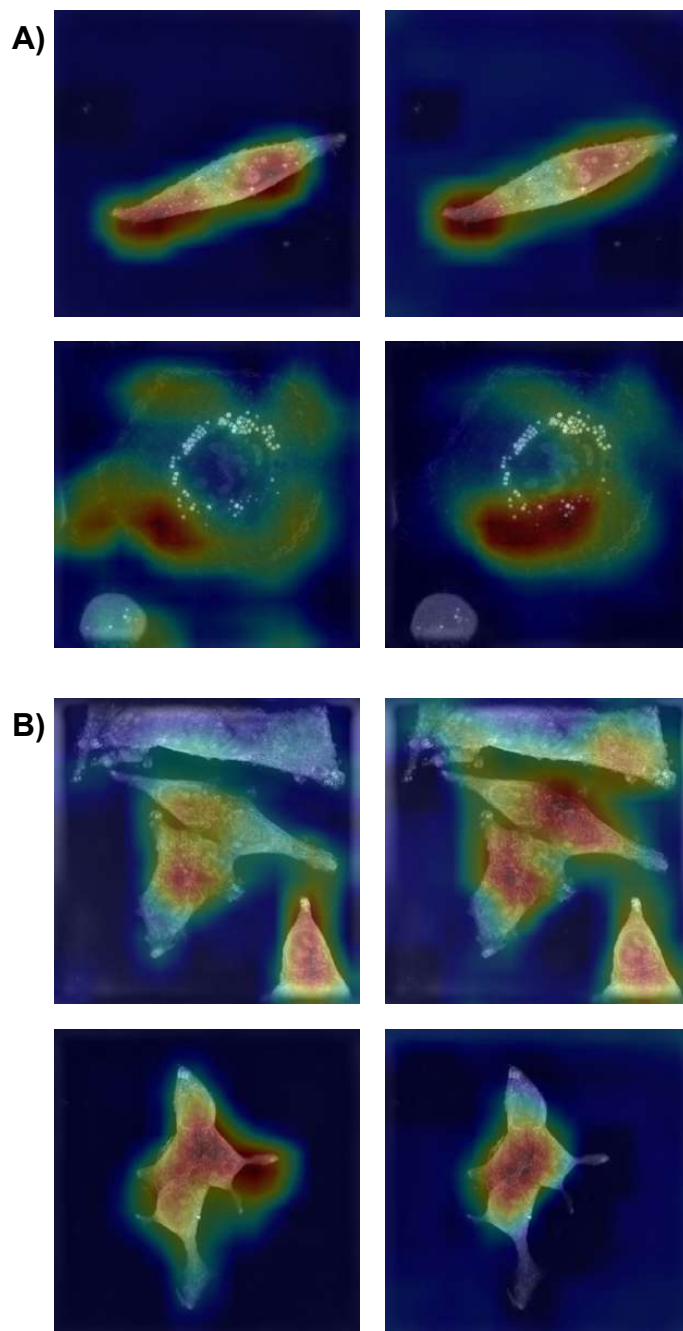
- [1] Monika Holubova, Martina Axmanova, Jaromir Gumulec, Martina Raudenska, Marketa Sztalmachova, Petr Babula, Vojtech Adam, Rene Kizek, and Michal Masarik. Kras $\text{nf-}\kappa\text{b}$ is involved in the development of zinc resistance and reduced curability in prostate cancer. *Metallomics*, 6(7):1240–1253, 2014.
- [2] Monika Kratochvilova, Martina Raudenska, Zbynek Heger, Lukas Richtera, Natalia Cernei, Vojtech Adam, Petr Babula, Marie Novakova, Michal Masarik, and Jaromir Gumulec. Amino acid profiling of zinc resistant prostate cancer cell lines: associations with cancer progression. *The Prostate*, 77(6):604–616, 2017.
- [3] Jaromír Gumulec, M Masarik, S Krizkova, V Adam, J Hubalek, J Hrabeta, T Eckschlager, M Stiborova, and René Kizek. Insight to physiology and pathology of zinc (ii) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Current medicinal chemistry*, 18(33):5041–5051, 2011.
- [4] Ning Ke, Xiaobo Wang, Xiao Xu, and Yama A Abassi. The xcelligence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. In *Mammalian cell viability*, pages 33–43. Springer, 2011.
- [5] Luis G Rodriguez, Xiaoyang Wu, and Jun-Lin Guan. Wound-healing assay. In *Cell Migration*, pages 23–29. Springer, 2005.
- [6] Nicolaas AP Franken, Hans M Rodermond, Jan Stap, Jaap Haveman, and Chris Van Bree. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5):2315–2319, 2006.
- [7] Martina Raudenska, Monika Kratochvilova, Tomas Vicar, Jaromir Gumulec, Jan Balvan, Hana Polanska, Jan Pribyl, and Michal Masarik. Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in prostate cancer cells by actin accumulation. *Scientific reports*, 9(1):1–11, 2019.
- [8] Mirjam Schürmann, Jana Scholze, Paul Müller, Chii J Chan, Andrew E Ekenyong, Kevin J Chalut, and Jochen Guck. Refractive index measurements of single, spherical cells using digital holographic microscopy. *Methods in cell biology*, 125:143–159, 2015.
- [9] Lisa Pollaro, Sebastien Equis, Bastien Dalla Piazza, and Yann Cotte. Stain-free 3d nanoscopy of living cells: A new holographic tomographic microscope for quantitative and non-invasive 3d live cell nanoscopy. *Optik & Photonik*, 11(1):38–42, 2016.

- [10] Anubha Gupta and Ritu Gupta. *Isbi 2019 c-nmc challenge: Classification in cancer cell imaging*. Springer, 2020.
- [11] Daniel Graupe. *Principles of artificial neural networks*, volume 7. World Scientific, 2013.
- [12] Warren S Sarle. Neural networks and statistical models. 1994. URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.27.699&rep=rep1&type=pdf>.
- [13] Convolutional neural networks for visual recognition. URL: <https://cs231n.github.io/neural-networks-1/>.
- [14] Ivan Nunes Da Silva, Danilo Hernane Spatti, Rogerio Andrade Flauzino, Luisa Helena Bartocci Liboni, and Silas Franco dos Reis Alves. Artificial neural network architectures and training processes. In *Artificial neural networks*, pages 21–28. Springer, 2017.
- [15] Sagar Sharma. Activation functions in neural networks. *Towards Data Science*, 6, 2017.
- [16] Chigozie Nwankpa, Winifred Ijomah, Anthony Gachagan, and Stephen Marshall. Activation functions: Comparison of trends in practice and research for deep learning. *arXiv preprint arXiv:1811.03378*, 2018.
- [17] Harish Narayanan. Convolutional neural networks for artistic style transfer, Mar 2017. URL: <https://harishnarayanan.org/writing/artistic-style-transfer/>.
- [18] Neha Gupta. Artificial neural network. *Network and Complex Systems*, 3(1):24–28, 2013.
- [19] Qi Wang, Yue Ma, Kun Zhao, and Yingjie Tian. A comprehensive survey of loss functions in machine learning. *Annals of Data Science*, pages 1–26, 2020.
- [20] Lisa Torrey and Jude Shavlik. Transfer learning. In *Handbook of research on machine learning applications and trends: algorithms, methods, and techniques*, pages 242–264. IGI global, 2010.
- [21] Jia Deng, Wei Dong, Richard Socher, Li-Jia Li, Kai Li, and Li Fei-Fei. Imagenet: A large-scale hierarchical image database. In *2009 IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, pages 248–255. Ieee, 2009.
- [22] Minyoung Huh, Pulkit Agrawal, and Alexei A Efros. What makes imagenet good for transfer learning? *arXiv e-prints*, pages arXiv–1608, 2016.

- [23] Gradient. URL: <https://www.britannica.com/science/gradient-mathematics>.
- [24] Michael A Nielsen. *Neural networks and deep learning*, volume 2018. Determination press San Francisco, CA, 2015.
- [25] Sebastian Ruder. An overview of gradient descent optimization algorithms. *arXiv preprint arXiv:1609.04747*, 2016.
- [26] Sanket Doshi. Various optimization algorithms for training neural network, Aug 2020. URL: <https://towardsdatascience.com/optimizers-for-training-neural-network-59450d71caf6>.
- [27] Keiron O’Shea and Ryan Nash. An introduction to convolutional neural networks. *arXiv preprint arXiv:1511.08458*, 2015.
- [28] Waseem Rawat and Zenghui Wang. Deep convolutional neural networks for image classification: A comprehensive review. *Neural computation*, 29(9):2352–2449, 2017.
- [29] Mehmet Sarıgül, Buse Melis Ozyildirim, and Mutlu Avcı. Differential convolutional neural network. *Neural Networks*, 116:279–287, 2019.
- [30] Nils Bjorck, Carla P Gomes, Bart Selman, and Kilian Q Weinberger. Understanding batch normalization. In *Advances in Neural Information Processing Systems*, pages 7694–7705, 2018.
- [31] Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, and Jian Sun. Deep residual learning for image recognition. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, pages 770–778, 2016.
- [32] Poonam Dhankhar. Resnet-50 and vgg-16 for recognizing facial emotions. *International Journal of Innovations in Engineering and Technology (IJJET)*, 13(4):126–130, 2019.
- [33] Ramprasaath R Selvaraju, Michael Cogswell, Abhishek Das, Ramakrishna Vedantam, Devi Parikh, and Dhruv Batra. Grad-cam: Visual explanations from deep networks via gradient-based localization. In *Proceedings of the IEEE international conference on computer vision*, pages 618–626, 2017.
- [34] Ramprasaath R Selvaraju, Abhishek Das, Ramakrishna Vedantam, Michael Cogswell, Devi Parikh, and Dhruv Batra. Grad-cam: Why did you say that? *arXiv preprint arXiv:1611.07450*, 2016.

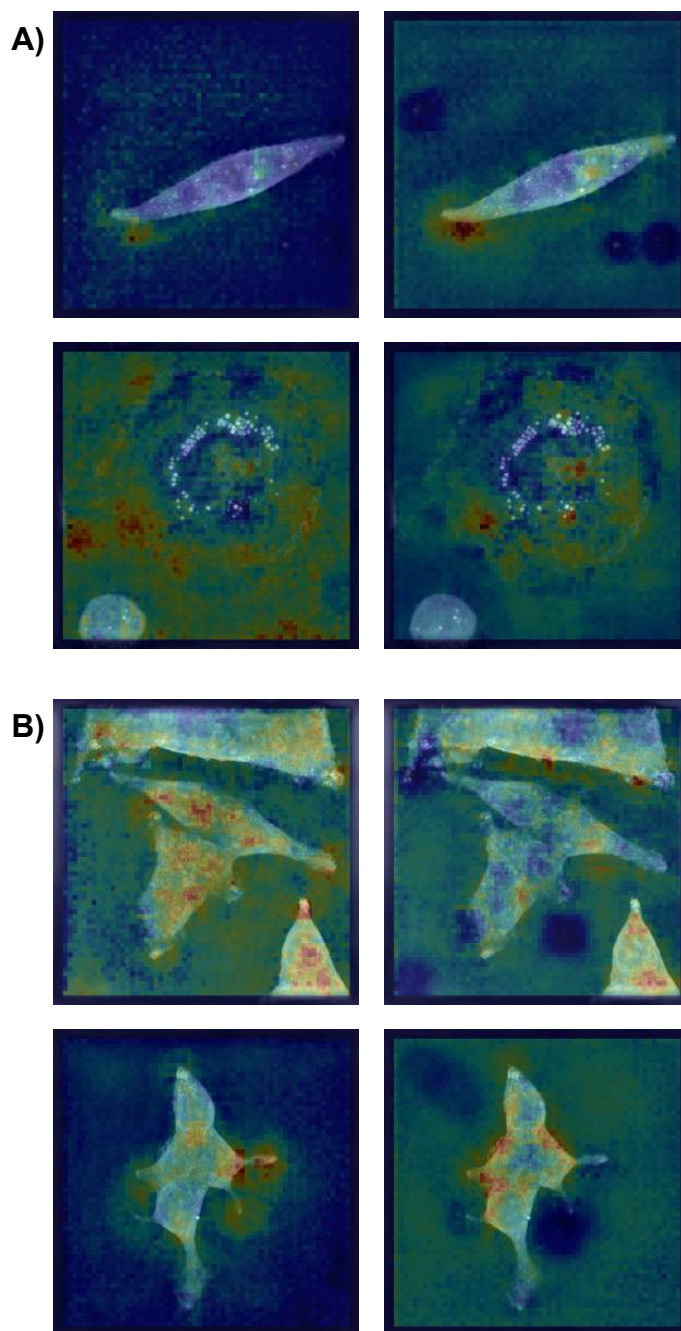
- [35] Matthew D Zeiler and Rob Fergus. Visualizing and understanding convolutional networks. In *European conference on computer vision*, pages 818–833. Springer, 2014.
- [36] Anil Chandra Naidu Matcha. Class activation maps: Visualizing neural network decision-making, Feb 2020. URL: shorturl.at/gtvE1.
- [37] Purva Huilgol. Accuracy vs. f1-score, Aug 2019. URL: <https://medium.com/analytics-vidhya/accuracy-vs-f1-score-6258237beca2>.
- [38] Monika Kratochvilova, Martina Raudenska, Zbynek Heger, Lukas Richtera, Natalia Cernei, Vojtech Adam, Petr Babula, Marie Novakova, Michal Masarik, and Jaromir Gumulec. Amino acid profiling of zinc resistant prostate cancer cell lines: Associations with cancer progression. *The Prostate*, 77(6):604–616, 2017. doi:10.1002/pros.23304.
- [39] Live cell imaging microscope: 3d cell explorer, Dec 2020. URL: <https://www.nanolive.ch/products/3d-microscopes/cx/>.
- [40] Jacobgil. jacobgil/pytorch-grad-cam. URL: <https://github.com/jacobgil/pytorch-grad-cam>.
- [41] Matthew J Zdilla, Scott A Hatfield, Kennedy A McLean, Leah M Cyrus, Jilian M Laslo, and H Wayne Lambert. Circularity, solidity, axes of a best fit ellipse, aspect ratio, and roundness of the foramen ovale: a morphometric analysis with neurosurgical considerations. *The Journal of craniofacial surgery*, 27(1):222, 2016.
- [42] Julie Leca, Sébastien Martinez, Sophie Lac, Jérémy Nigri, Véronique Secq, Marion Rubis, Christian Bressy, Arnaud Sergé, Marie-Noelle Lavaut, Nelson Duseti, et al. Cancer-associated fibroblast-derived annexin a6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. *The Journal of clinical investigation*, 126(11):4140–4156, 2016.
- [43] Domenico Albino, Martina Falcione, Valeria Uboldi, Dada Oluwaseyi Temilola, Giada Sandrini, Jessica Merulla, Gianluca Civenni, Aleksandra Kokanovic, Alessandra Stürchler, Dheeraj Shinde, et al. Circulating extracellular vesicles release oncogenic mir-424 in experimental models and patients with aggressive prostate cancer. *Communications biology*, 4(1):1–13, 2021.

A Ukážky lokalizačných máp metódy Grad-CAM



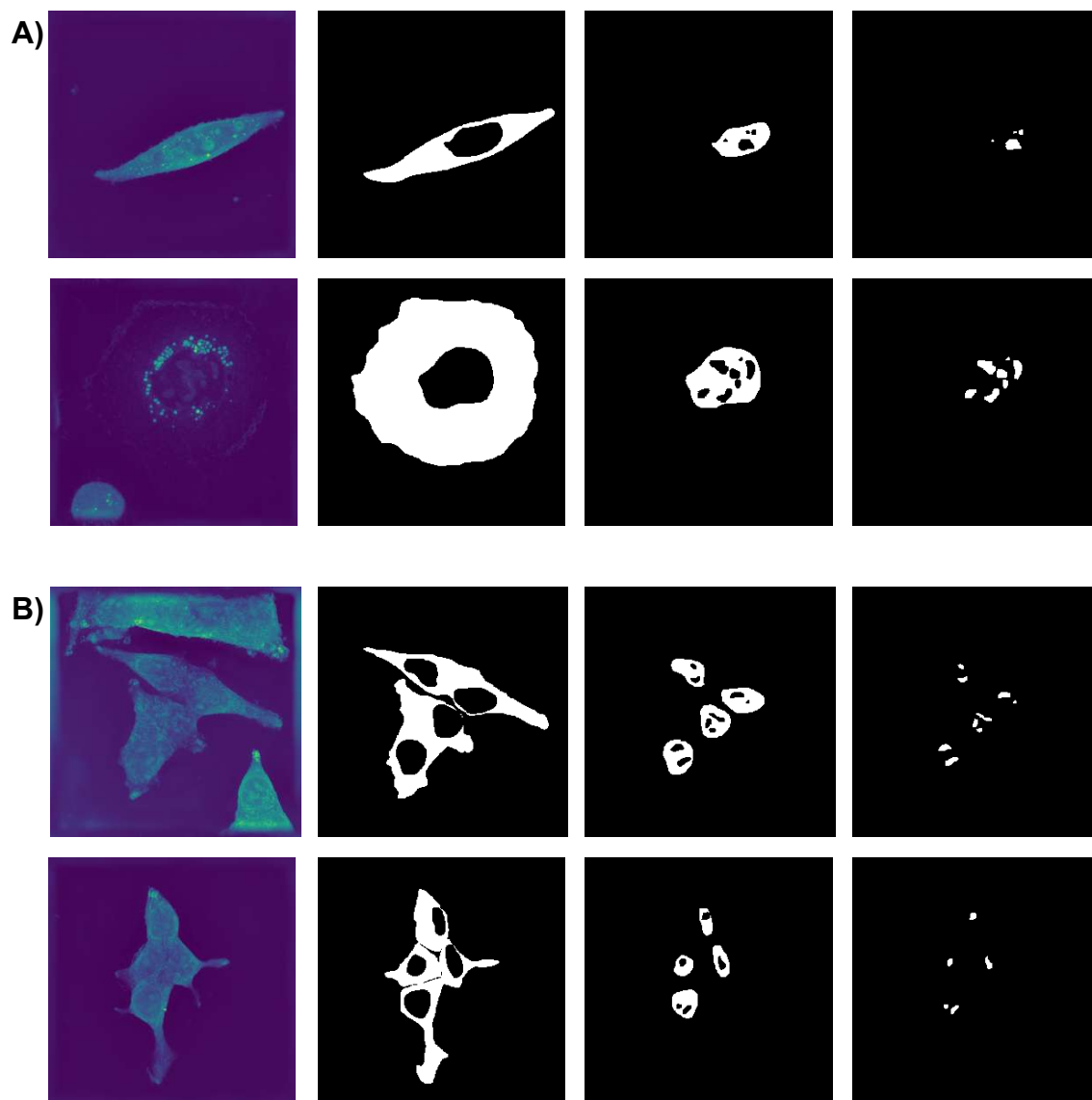
Obr. A.1: Ukážky lokalizačných máp metódy Grad-CAM; A) bunky PC-3, B) bunky 22Rv1; vľavo pre klasifikáciu bunkovej línie, vpravo pre klasifikáciu rezistencie.

B Ukážky lokalizačných máp metódy oklúzie



Obr. B.1: Ukážky lokalizačných máp metódy oklúzie; A) bunky PC-3, B) bunky 22Rv1; vľavo pre klasifikáciu bunkovej línie, vpravo pre klasifikáciu rezistencie.

C Ukážky segmentačných masiek



Obr. C.1: Ukážky segmentačných masiek.; A) bunky PC-3, B) bunky 22Rv1; z ľava: obraz bunky (max-projekcia), cytoplazma, jadrá bez jadierok, jadierka.

D Obsah priložených súborov

```
/majercik_bp ..... koreňový adresár priloženého média
├── data ..... dátové súbory potrebné na demonštráciu
│   ├── 067.tiff ..... 3D vstupný obraz
│   ├── 067_c1_cell.png ..... maska bunky
│   ├── 067_c1_cytoplasm.png ..... maska cytoplazmy
│   ├── 067_c1_nucleus.png ..... maska jadier
│   ├── 067_c1_nucleolus.png ..... maska jadierok
│   └── 067_c1_nucleus_w_nucleolus.png ..... maska jadier bez jadierok
├── model ..... zložka pre natrénovaný model
├── blurSharpAugmenter.py ..... skript implementujúci ostrenie a rozostrenie
├── dataloader.py ..... skript na načítanie dát
├── demo.py ..... skript na spustenie demonštrácie
├── gradcam.py ..... skript implementujúci metódu Grad-CAM
├── heatmap_eval.py ..... skript na evaluáciu lokalizačných máp
├── heatmap_generator.py ..... skript na generovanie lokalizačných máp
├── occlusionF.py ..... skript implementujúci metódu oklúzie
├── process3D.py ..... skript na tvorbu 2D obrazov
├── train_cross_val.py ..... trénovací skript
└── README.txt ..... návod na inštaláciu a spustenie
```